

# **Die Funktion der ubiquitinbindenden CUE-Domäne von Cue1 bei der Synthese von Ubiquitinketten**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

**Diplom-Biochemiker Maximilian von Delbrück**

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter:

1. Prof. Dr. Thomas Sommer

2. Prof. Dr. Udo Heinemann

3. Prof. Dr. Andreas Herrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.05.2016



# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>A</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>B</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Ubiquitin und ähnliche Proteine .....	1
1.2 Ubiquitinierungskaskade.....	2
1.3 Aufbau und Wirkung von Ubiquitinsignalen .....	4
1.4 Proteinabbau und Proteinqualitätskontrolle .....	7
1.5 Ubiquitin-Proteasom-System, ER-assoziiierter Proteinabbau und <i>unfolded protein response</i> .....	8
1.6 Verschiedene E2/E3-Systeme im Vergleich .....	11
1.7 Ubiquitinbindende Domänen .....	13
1.8 Das Proteasom und assoziierte Deubiquitinasen .....	15
1.9 Zielsetzung der Arbeit.....	16
<b>2. ERGEBNISSE.....</b>	<b>18</b>
2.1 Fluoreszenz-basierte Untersuchungen von <i>in vitro</i> Ubiquitinierungsreaktionen .....	18
2.1.1 <i>In vitro</i> Ubiquitinierungsreaktionen mit cCue1 und Ubc7 .....	18
2.1.2 Fluoreszenzmarkierung von Ubiquitinmolekülen .....	19
2.1.3 Fluoreszenz-basierte Methoden zur Untersuchung von Polyubiquitinierungsreaktionen .....	21
2.1.3.1 FRET-basierte Untersuchungen mit vollständiger Fluoreszenzmarkierung .....	22
2.1.3.2 FRET-basierte Untersuchungen mit partieller Fluoreszenzmarkierung .....	24
2.1.3.3 Fluoreszenzanisotropiemessungen .....	28
2.1.3.4 Korrelation der FRET- und Fluoreszenzanisotropiemessungen .....	30
2.1.4 Angepasste Reaktionen der <i>in vitro</i> Ubiquitinierung .....	31
2.1.5 Die präparative Synthese von Ubiquitinketten.....	33
2.1.6 Kettenverlängerung und Ketten-Ketten-Verknüpfung.....	35
2.1.7 Fluoreszenzanisotropiemessungen verfolgen Verlängerungsreaktionen von Ubiquitinketten.....	37
2.1.8 cCue1 stimuliert die Verlängerung von Ubiquitinketten durch Ubc7.....	40
2.1.8.1 Die Bindungsaffinität der Cue1-CUE-Domäne korreliert mit der Geschwindigkeit der Kettenverlängerung <i>in vitro</i> und dem Substratabbau <i>in vivo</i> .....	42
2.1.8.2 Die Art der Kettenverknüpfung beeinflusst die Kettenverlängerung.....	44
2.1.8.3 Die Länge einer Ubiquitinkette beeinflusst die Kettenverlängerung.....	46
2.1.8.4 Quantifizierung der Beschleunigung von Verlängerungsreaktionen durch die Cue1-CUE-Domäne	48
2.1.8.5 Die CUE-Domäne stimuliert die Verlängerung von Ubiquitinketten, nicht aber von Monoubiquitin	50

2.1.8.6	Die Hrd1-RING-Domäne unterstützt die Kettenverlängerung durch cCue1/Ubc7 .....	51
2.1.8.7	Die Cue1-CUE-Domäne bindet die proximale Einheit von K48-Diubiquitin stärker als das distale Ubiquitinmolekül.....	54
2.1.8.8	Die Wechselwirkung von cCue1 mit der proximalen Ubiquitineinheit von Diubiquitin stimuliert die Kettenverlängerung am stärksten .....	55
2.1.8.9	Die Wechselwirkung von cCue1 mit der zum Akzeptorubiquitin benachbarten Ubiquitineinheit stimuliert die Kettenverlängerung .....	59
2.1.9	cCue1/Ubc7 verzweigt linear oder K63-verknüpfte Ketten <i>in vitro</i> .....	61
2.1.10	Massenspektrometrischer Nachweis von K48/K63-verzweigten Ubiquitinketten .....	63
<b>2.2</b>	<b>Fluoreszenz-basierte Untersuchungen von <i>in vitro</i> Deubiquitinierungsreaktionen .....</b>	<b>65</b>
2.2.1	Die Aktivitäten von Ubp6, Rpn8/11 und <i>Lid-core</i> in Isolation.....	65
2.2.2	Fluoreszenzanisotropiemessungen verfolgen den Abbau von Ubiquitinketten .....	68
<b>3.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>71</b>
<b>3.1</b>	<b><i>In vitro</i> Ubiquitinierungsreaktionen mit cCue1 und Ubc7 .....</b>	<b>72</b>
<b>3.2</b>	<b>Fluoreszenz-basierte Untersuchungen von <i>in vitro</i> Ubiquitinierungsreaktionen .....</b>	<b>73</b>
<b>3.3</b>	<b>Die CUE-Domäne von Cue1 stimuliert die Polyubiquitinierung durch Ubc7 .....</b>	<b>75</b>
3.3.1	Korrelation von Bindungsaffinität, Kettenverlängerung und Substratabbau.....	75
3.3.2	Die CUE-Domäne von Cue1 und gp78 im Vergleich.....	77
3.3.3	Eine Erklärung für die Stimulation der Kettenverlängerung auf molekularer Ebene.....	77
3.3.4	Die Cue1-CUE-Domäne bindet präferentiell K48-verknüpfte Ubiquitinmoleküle.....	79
3.3.5	Ein Model, das die CUE-Domänen assistierte Kettenverlängerung beschreibt .....	80
<b>3.4</b>	<b>Die RING-Domäne von Hrd1 unterstützt die Bildung von Ubiquitinketten durch Ubc7 .....</b>	<b>82</b>
<b>3.5</b>	<b>Verzweigung von Ubiquitinketten und Ketten-Ketten-Verknüpfung.....</b>	<b>83</b>
<b>3.6</b>	<b>Identifizierung von ubiquitinbindenden Domänen mit Präferenz für K48/K63-verzweigte Ketten .....</b>	<b>84</b>
<b>3.7</b>	<b>Charakterisierung der proteasomalen DUBs Ubp6 und Rpn11 in Isolation .....</b>	<b>86</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>89</b>
<b>4.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>89</b>
4.1.1	Bakterien- und Hefestämme.....	89
4.1.2	Plasmide .....	89
4.1.3	Oligonukleotide .....	91
4.1.4	Antikörper und Enzyme .....	92
4.1.5	Größenstandards.....	93
4.1.6	Chemikalien .....	93
4.1.7	Lösungen, Puffer und Nährmedien.....	95
4.1.7.1	Nährmedien für Bakterienkulturen.....	95



4.1.7.2	Nährmedien für Hefekulturen.....	95
4.1.7.3	Lösungen und Puffer für molekular- und zellbiologische Methoden .....	96
4.1.7.4	Lösungen und Puffer für biochemische Methoden.....	96
4.1.8	Verbrauchsmaterialien.....	98
4.1.9	Geräte.....	99
4.1.10	Computerprogramme .....	100
<b>4.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>101</b>
4.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	101
4.2.1.1	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNS .....	101
4.2.1.2	Restriktionsverdau und DNS-Ligation .....	101
4.2.1.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	102
4.2.1.4	Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen.....	102
4.2.1.5	Polymerasekettenreaktion.....	102
4.2.1.6	DNS-Sequenzierung.....	103
4.2.2	Zellbiologische Methoden.....	104
4.2.2.1	Herstellung von elektrokompetenten <i>E. coli</i> -Zellen .....	104
4.2.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> .....	104
4.2.2.3	Heterologe Expression in <i>E. coli</i> .....	104
4.2.2.4	Zellaufschluss.....	105
4.2.2.5	Hefetransformation.....	105
4.2.2.6	Cycloheximid-Abbauexperiment.....	105
4.2.3	Biochemische Methoden.....	106
4.2.3.1	Reinigung von GST-Fusionsproteinen .....	106
4.2.3.2	Reinigung von Proteinen mit His <sub>6</sub> -Affinitätsmarkierung .....	107
4.2.3.3	Reinigung von Ubiquitin und Ubiquitinvarianten .....	107
4.2.3.4	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry .....	107
4.2.3.5	Absorptionsmessungen.....	108
4.2.3.6	Spezifische Fluoreszenzmarkierung der Cysteinvariante von Ubiquitin.....	108
4.2.3.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	108
4.2.3.8	Fluoreszenz-Scanning.....	109
4.2.3.9	<i>Western Blotting (Immunoblotting)</i> .....	109
4.2.3.10	Coomassie-Färbung von Proteinen.....	109
4.2.3.11	Präparative Synthese und Reinigung von Ubiquitinketten .....	110
4.2.3.12	Fluoreszenz-basierte Untersuchungen von <i>in vitro</i> Ubiquitinierungs- und Deubiquitinierungsreaktionen .....	111
4.2.3.12.1	FRET-basierte Untersuchungen der <i>in vitro</i> Kettensynthese.....	111
4.2.3.12.2	Fluoreszenzanisotropiemessungen von <i>in vitro</i> Ubiquitinierungsreaktionen .....	112

4.2.3.12.3 Analysen von Deubiquitinierungsreaktionen.....	113
4.2.3.13 Beladungsreaktionen von E1- oder E2-Enzymen.....	113
<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>114</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>129</b>
<b>PUBLIKATIONEN UND VORTRÄGE.....</b>	<b>135</b>
<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>136</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>137</b>

## Zusammenfassung

Ubiquitinierungen sind dynamische, posttranslationale Proteinmarkierungen, die eine Vielzahl zellulärer Reaktionen hervorrufen. Die strukturell unterschiedlichen Signale werden von einer Ubiquitinierungsmaschinerie, bestehend aus E1-, E2- und E3-Enzymen, aufgebaut. Die Synthese von Polyubiquitin wird durch ubiquitinbindende Domänen (UBD) innerhalb der enzymatischen Kaskade stimuliert.

Das E2-Enzym Ubc7 katalysiert zusammen mit dessen Kofaktor Cue1 die Polymerisierung von Ubiquitineinheiten und kennzeichnet Substratproteine mit Lysin 48 (K48)-verknüpften Ubiquitinketten für den Endoplasmatische Retikulum-assoziierten Proteinabbau (*ER-associated protein degradation*, ERAD). In dieser Arbeit konnte mittels *in vitro* rekonstituierter Ubiquitinierungsreaktionen die Funktionsweise der ubiquitinbindenden CUE-Domäne von Cue1 während der Synthese von Polyubiquitin aufgeklärt werden. Verlängerungsreaktionen von Ubiquitinketten konnten durch Fluoreszenzmessungen verfolgt und die CUE-Domäne als Substratrezeptor von Ubc7 beschrieben werden. Anscheinend erhöht die Ubiquitinbindung durch Cue1 die lokale Konzentration von Ubc7 an den Ketten und positioniert das E2-Enzym effizient für die Übertragung der gebundenen Ubiquitineinheit. Die Reaktionen werden durch eine Bindungspräferenz der Cue1-CUE-Domäne für K48-verknüpfte Ubiquitinmoleküle zusätzlich beschleunigt. Es ist bekannt, dass UBDs Ubiquitinsignale entschlüsseln. Die Charakterisierung der CUE-Domäne beschreibt eine Notwendigkeit der Bindung von Ubiquitin bereits während der Entstehung von Polyubiquitin. Neben den E3-Ubiquitinligasen existieren Deubiquitinasen (DUB), die an der Reifung und dem Abbau von Ubiquitinsignalen beteiligt sind. Die proteasomalen DUBs Ubp6 und Rpn11 zeigen basale Aktivitäten in Isolation, die eingebunden in den 26S-Komplex moduliert werden. Fluoreszenz-basierte Untersuchungen von Kettenabbaureaktionen lassen erste Schlüsse über die Spezifitäten und die Abbaumechanismen der Enzyme zu.

## Abstract

Polyubiquitination is an essential process modulating protein function in eukaryotic cells. Only recently ubiquitin binding activity has emerged as an important factor in ubiquitin chain assembly. Cue1 is a crucial component of yeast endoplasmic reticulum associated protein degradation complexes which recruits and activates the E2 ubiquitin conjugating enzyme Ubc7. Our NMR solution structure reveals an unconventional CUE domain of Cue1 that substantially stimulates ubiquitin chain elongation by Ubc7. Results from NMR analysis combined with interaction studies and in vitro ubiquitination reactions imply that binding of CUE to a ubiquitin moiety adjacent to the acceptor ubiquitin is a prerequisite for rapid chain elongation. By this mode of action, the CUE domain counteracts the inability of associated Ubc7, to progressively elongate ubiquitin chains. Elongation of K48-linked ubiquitin chains is additionally accelerated since the CUE domain preferentially binds chains of K48-linkage. Our data support a model, where dynamic binding of ubiquitin chains assist to position Ubc7 for rapid elongation of K48-linked chains. Thus, the CUE domain acts as acceleration factor of elongation. Our study provides detailed mechanistic insight into how a ubiquitin binding domain governs polyubiquitin chain formation.

**Schlagwörter:** Polyubiquitinierung, Ubiquitin-konjugierendes Enzym, Ubiquitinbindende Domäne, CUE-Domäne, Kettenverlängerung

Polyubiquitination, ubiquitin conjugating enzyme, ubiquitin binding domain, CUE domain, ubiquitin chain elongation

# 1. Einleitung

## 1.1 Ubiquitin und ähnliche Proteine

Proteine werden mit Ubiquitinmolekülen verknüpft, um sie zu markieren. Die 76 Aminosäuren nehmen eine globuläre *beta-grasp* Faltung ein und weisen neben einem kompakten N-terminalen Bereich einen flexiblen C-Terminus auf (Abbildung 1-2). Die Struktur von Ubiquitin ist aufgrund einer hohen Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen und eines hydrophoben Kerns äußerst stabil [1], wodurch seine Funktion auch unter zellulären Stressbedingungen gewährleistet wird [2,3]. Die Aminosäuresequenz ist mit drei konservativen Substitutionen von der Hefe zum Menschen hochkonserviert und veranschaulicht die Beständigkeit der Struktur und demzufolge der Funktion der Proteinmarkierung. Ubiquitin wird von mehreren Genkopien als Fusionsprotein mit ribosomalen Proteinen oder in sechsfacher Wiederholung als Antwort auf Zellstress exprimiert [4,5,6,7]. Funktionelle Monomere entstehen durch deubiquitinierende Enzyme (DUB) unter ko- oder posttranslationaler Spaltung von Peptidbindungen. Ubiquitinsignale sind vielfältig [8] und werden von Bindungspartnern mithilfe von ubiquitinbindenden Domänen (UBD) erkannt, die hauptsächlich mit einem hydrophoben Bereich von Ubiquitin um Isoleucin 44 (Ile44) wechselwirken [9].

Neben Ubiquitin existieren weitere Polypeptide mit vergleichbarer Tertiärstruktur, die in ähnlicher Weise als posttranslationale Proteinmodifikation fungieren [10]. In Säugetieren wurden bislang zehn verschiedene Ubiquitin-ähnliche Proteine (UBL, *ubiquitin-like protein*) gefunden, die von individuellen enzymatischen Systemen an Substratproteine konjugiert werden [11]. Am besten charakterisiert sind Sumoylierungen (Smt3), Neddylierungen (Rub1), Urmyleerungen (Urm1) und Modifikationen mit Autophagiefaktoren (Atg8, Atg12) [12]. UBX-Proteine (*ubiquitin regulatory X*) enthalten ebenfalls einen ubiquitinähnlichen Strukturbereich und regulieren das Chaperon Cdc48 räumlich und zeitlich bei seinen vielfältigen Aufgaben [13]. Proteine mit UBL- oder UBX-Domänen lokalisieren Zielproteine und wirken meist als Adapter, die Substrate über Ubiquitinrezeptoren an nachgeschaltete Proteinkomplexe transportieren. Npl4 beispielsweise wechselwirkt *via* einer UBX-ähnlichen-Domäne mit der N-terminalen Domäne von Cdc48 und rekrutiert polyubiquitinierte Substratproteine über einen ubiquitinbindenden Zinkfinger an den Komplex [14,15]. Rad23 und Dsk2 binden mit UBL-Domänen an Ubiquitinrezeptoren des Proteasoms und vermitteln über UBDs den proteolytischen Abbau von polyubiquitinierten Proteinen [16,17]. Ubp6 ist ein Proteasom-

assoziiertes DUB, das anhand einer UBL-Faltung mit Rezeptoren des Proteasekomplexes interagiert [18].

### 1.2 Ubiquitinierungskaskade

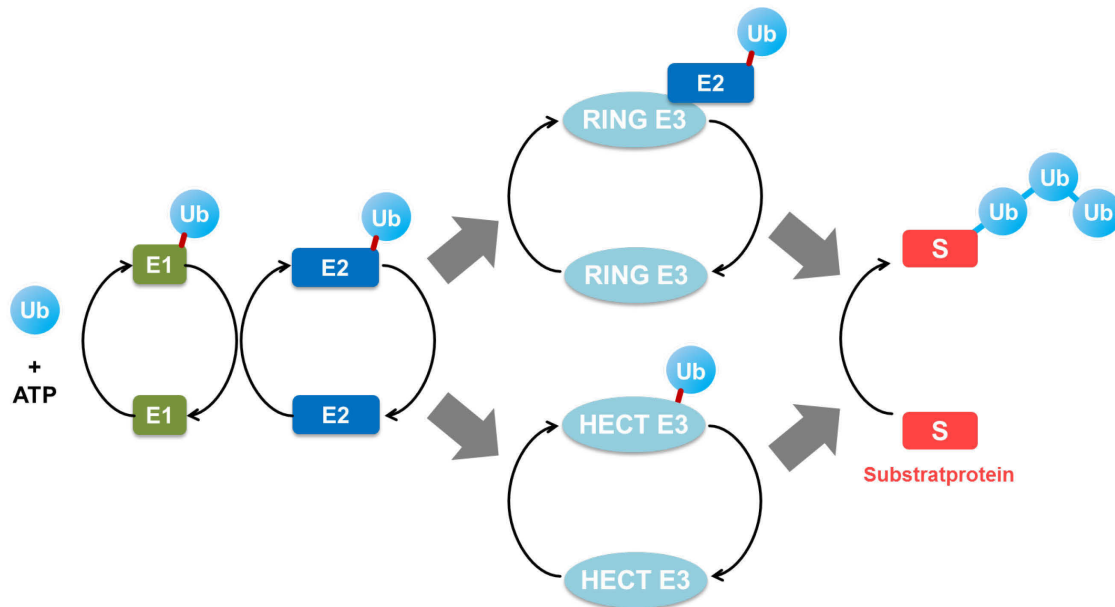
Ubiquitinierungsreaktionen sind gezielte Markierungsprozesse in der Zelle, die ausgewählte Proteinpopulationen kennzeichnen. Diese posttranslationale Modifikation von Proteinen erfolgt durch eine enzymatische Kaskade (Abbildung 1-1), die hierarchisch organisiert ist. In Hefe existieren ein E1, elf E2- und 60-100 E3-Enzyme [19,20]. In einem ersten Schritt aktiviert das E1-Enzym, das alternativ als Ubiquitin-aktivierendes Enzym bezeichnet wird, Ubiquitineinheiten unter Spaltung von ATP und bildet mit der Thiolgruppe des katalytischen Cysteins und der freien Carboxylgruppe des C-terminalen Glycins von Ubiquitin einen Thioester. In einer zweiten Reaktion wird das Molekül auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (*Ubiquitin conjugating enzyme*, Ubc oder E2) übertragen, wobei die energiereiche Bindung erhalten bleibt. E3-Ubiquitinligasen vermitteln die Ubiquitinierung von Substratproteinen vorwiegend an Lysinresten (K) und katalysieren die Bildung von Isopeptidbindungen zwischen einer  $\epsilon$ -Aminogruppe des K und dem C-Terminus von Ubiquitin.

E2-Enzyme stehen in der Mitte der Enzymkaskade und garantieren den gerichteten Ubiquitintransfer auf das Substrat. Einerseits benutzen das E1 und E3 überlappende Bindungsstellen auf dem E2 [21] und andererseits variieren die Bindungsaffinitäten des E2-Enzyms je nach dessen Beladungszustand mit Ubiquitin [22]. Ein beladenes E2 bindet ein E3 affiner als ein E1, während ein nicht-beladenes E2 präferentiell mit dem E1 wechselwirkt.

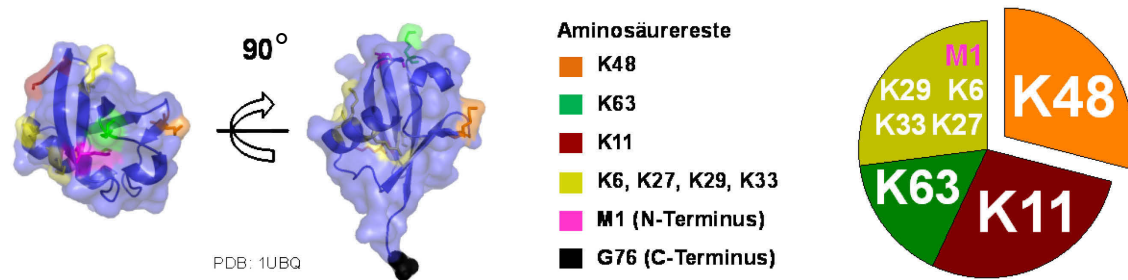
Ubiquitinligasen können in zwei Klassen unterteilt werden [23]. RING-Ubiquitinligasen (*Really Interesting New Gene 1*) binden gleichzeitig E2-Enzyme und Zielproteine. Die charakteristischen RING-Domänen komplexieren Zink-Ionen und erleichtern die Dissoziation des E2-gebundenen Ubiquitinmoleküls [24,25]. HECT-Ubiquitinligasen (*Homologous to E6AP Carboxy-Terminus*) enthalten einen Cysteinrest in der katalytisch aktiven Domäne und binden Ubiquitin kovalent, bevor es auf das Zielprotein übertragen wird [26].

Ähnlich zu anderen posttranslationalen Proteinmodifikationen ist eine Ubiquitinierung reversibel [27]. Deubiquitinasen (DUB) sind Isopeptidasen, die Ubiquitinverknüpfungen spalten und somit zur Reifung von Ubiquitinsignalen beitragen oder Monoubiquitin regenerieren. Als dynamische Proteinmarkierungen können Polyubiquitinmoleküle durch Deubiquitinasen verkürzt oder durch E4-Enzyme verlängert werden. Diese speziellen E3-Ubiquitinligasen erkennen bereits ubiquitinierte Polypeptide und verlängern die Ubiquitinketten [28].

Das E4 Ufd2 und die Deubiquitinase Otu1 wurden assoziiert mit Cdc48-Komplexen entdeckt [29]. Auch am Proteasom existiert ein antagonistisch wirkendes Paar, bestehend aus Hul5, das Ketten erweitert, und dem deubiquitinierenden Enzym Ubp6 [30].



**Abbildung 1-1: Substratproteinen werden durch ein Zusammenspiel von drei Enzymen E1, E2 und E3 ubiquitiniert.** Die Ubiquitinierungskaskade ist hierarchisch aufgebaut. In Hefe existieren ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1), elf Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2) und zwischen 60-100 Ubiquitinligasen (E3). Ubiquitin wird unter Spaltung von ATP aktiviert und über einen energiereichen Thioester an das E1-Enzym gebunden. In einem zweiten Schritt wird die Ubiquitineinheit auf ein E2-Enzym übertragen. Vermittelt durch E3-Ubiquitinligasen werden Substratproteine selektiv ubiquitiniert. Neben den HECT-E3-Ubiquitinligasen, die ähnlich wie ein E2 das Ubiquitinmolekül über ein Cystein binden, koordinieren RING-E3-Ubiquitinligasen das Substratprotein und das ubiquitinbeladene E2-Enzym.

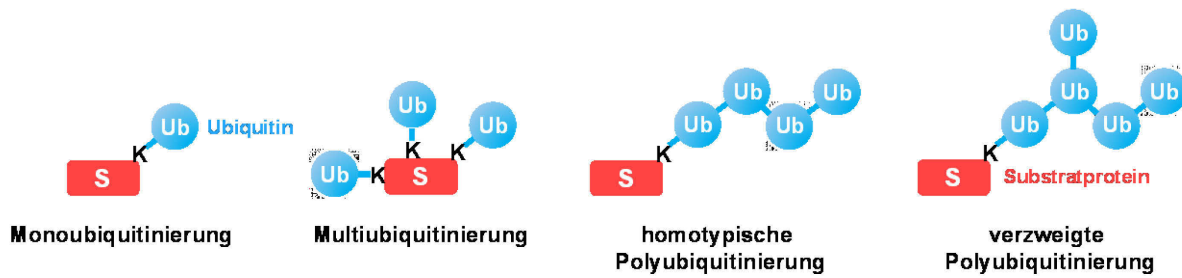


**Abbildung 1-2: Ubiquitinmoleküle werden verschiedenartig miteinander verknüpft und bauen Polyubiquitinsignale mit unterschiedlicher zellulärer Wirkung auf.** Ubiquitinmonomere werden über den C-Terminus (■ G76) mit dem N-Terminus (■ M1) oder einen der sieben Lysinreste einer weiteren Ubiquitineinheit verbunden. Diese unterschiedlichen Verknüpfungsarten führen zu abweichenden Konsequenzen für die Substratproteine. Am häufigsten treten Polyubiquitinierungen verknüpft über K48 (29 %, ■), K11 (28 %, ■), und K63 (16 %, ■) auf. K63-Polyubiquitin wird mit zellulärer Signaltransduktion in Verbindung gebracht, K11-Ketten werden im Laufe der Regulation des Zellzyklus gebildet und K48-Polyubiquitinierungen kennzeichnen Proteine für den selektiven Abbau durch Proteasomen. Der Aufbau von K48-verknüpften Polyubiquitinketten steht im Fokus dieser Arbeit.

### 1.3 Aufbau und Wirkung von Ubiquitinsignalen

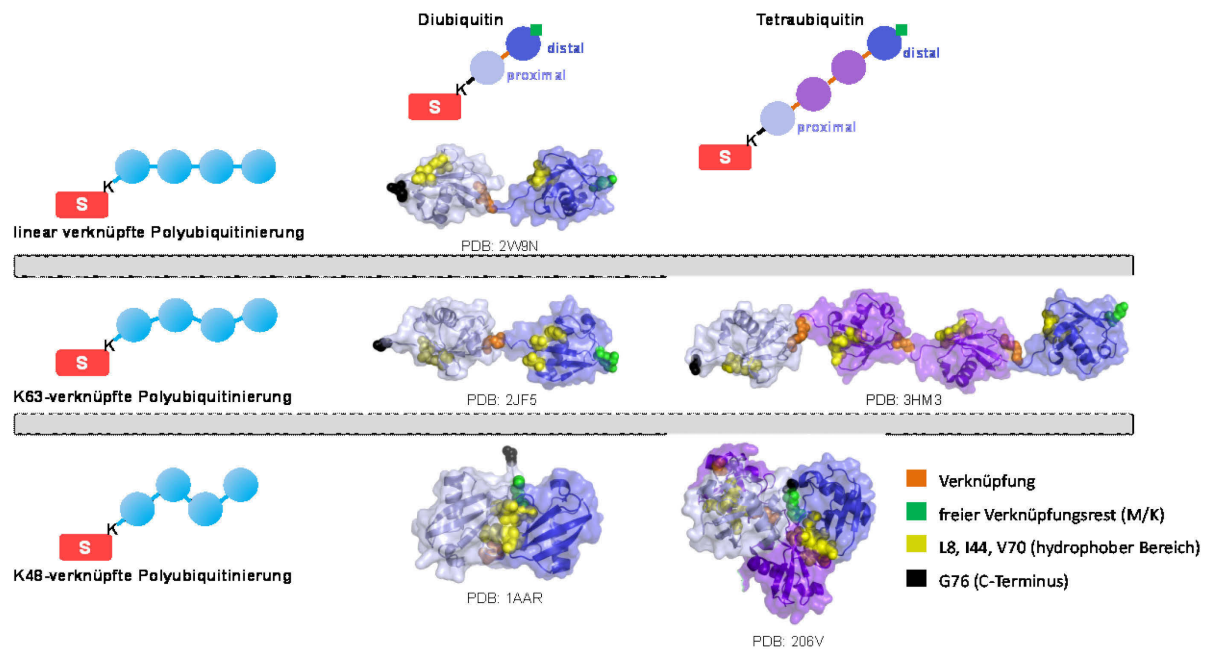
Die Struktur von Ubiquitinsignalen ist vielfältig (Abbildung 1-3). Bereits die Verknüpfung eines Ubiquitinmoleküls kann das Schicksal des Zielproteins verändern. Monoubiquitinierungen können gezielt auf eine bestimmte Aminosäure beschränkt sein [31] oder erfolgen flexibel innerhalb eines Proteinabschnitts [32]. Zudem kann eine Multiubiquitinierung, eine Markierung an mehreren Stellen eines Proteins, notwendig sein, um eine bestimmte Wirkung zu erzielen [33]. Durch Verknüpfungen von Ubiquitineinheiten miteinander werden komplexere Signale erzeugt. In Polyubiquitinmolekülen dient Ubiquitin selbst mit seinen sieben Lysinen (K6, K11, K27, K29, K33, K48 und K63) und dem N-Terminus als Akzeptor für weitere Einheiten (Abbildung 1-2). Ubiquitinketten sind aufgrund der unterschiedlichen Verknüpfung strukturell unterscheidbar und besitzen eine Direktionalität. Die proximale Ubiquitineinheit ist entweder mit dem Substratprotein verbunden oder weist einen freien C-Terminus auf. An dem distalen Molekül sind alle Verknüpfungsstellen für eine weitere Verlängerung der Kette verfügbar. Je nach Verknüpfungsart und Kettenlänge haben Polyubiquitinsignale unterschiedliche Konsequenzen für das Substrat [34,35]. Die zellulären Auswirkungen von einheitlich verknüpften, homotypischen Ubiquitinketten wurden größtenteils aufgeklärt. Seit einigen Jahren liegen gemischte Kettensignale mit unterschiedlichen Verknüpfungen im Fokus der Forschung [36,37,38].





**Abbildung 1-3: Der Aufbau von Ubiquitinsignalen ist vielfältig.** Ubiquitinmoleküle (Ub) werden vorwiegend an Lysinreste (K) von Substratproteinen (S) gebunden. Die posttranslationale Modifikation moduliert die Funktion des Zielproteins und kann durch einfache oder multiple Verknüpfungen von Ubiquitin erfolgen. Eine Monoubiquitinierung kann durch eine Verlängerung mit weiteren Ubiquitinmolekülen zu einem Polyubiquitinsignal erweitert werden und eine abweichende Auswirkung auf das Substrat haben. Ubiquitinketten sind unterschiedlich aufgebaut, wobei die Verknüpfungsart und die Anzahl der Monomere entscheidend sind.

Polyubiquitinsignale lösen unterschiedliche zelluläre Effekte aus, indem die abweichenden Strukturen der Polymere spezifisch von ubiquitinbindenden Domänen (1.7) nachgeschalteter Proteine erkannt werden [39,40]. Die Konformationen von Ubiquitinketten können vereinfacht in zwei Kategorien als „kompakt/geschlossen“ oder „flexibel/offen“ eingestuft werden (Abbildung 1-4). Bei K48-Verknüpfungen wechselwirken die einzelnen Ubiquitinmonomere über eine Region um Ile44 [41], wodurch die Kette am dichtesten gepackt ist. Die hydrophobe Bindungsstelle ist in dieser Anordnung größtenteils blockiert. Unter physiologischen Bedingungen ereignen sich jedoch dynamische Umgestaltungen der Kettenkonformation, wodurch die zentrale Oberfläche für Bindungspartner zugänglich wird [42,43]. Während bei K48-Ketten die Verknüpfungen rechtwinklig (Abbildung 1-2 und Abbildung 1-4) zur Achse des N- und C-Terminus von Ubiquitin positioniert sind, bilden lineare und K63-Verknüpfungen „geradlinige“ Polymere mit flexiblen Strukturen [44]. Bei den beiden letzteren Kettentypen sind die hydrophoben Bindungsstellen lösungsmittel exponiert.



**Abbildung 1-4: Polyubiquitinsignale werden durch die Verknüpfungsart der Ubiquitineinheiten und die Länge der Ubiquitinkette definiert.** Dargestellt sind Strukturen unterschiedlich verknüpfter Ubiquitinketten. Deren Orientierung und ausgewählte Aminosäuren sind farbig gekennzeichnet. Substratproteine sind über den C-Terminus (■) der proximalen Ubiquitineinheit (■) an Polyubiquitin gebunden. Die Verknüpfungsreste (■) der distalen Ubiquitineinheiten (■) sind frei und werden bei Verlängerung der Kette mit weiteren Ubiquitinmolekülen verbunden. Polymere mit Verknüpfungen der Monomere (■) über M1 (linear), K63 oder K48 nehmen eine zunehmend kompakte Konformation ein, wodurch die Zugänglichkeit der hydrophoben Bindungsstelle um Ile44 (■) eingeschränkt wird.

Ubiquitinmarkierungen sind in den unterschiedlichsten biologischen Prozessen involviert. Je nach der Struktur des Signals werden abweichende zelluläre Wirkungen erzielt. Monoubiquitinierungen spielen eine Rolle in Endozytosevorgängen, der Reparatur von DNS-Schäden und der transkriptionellen Regulation [45]. Lineare Ubiquitinketten, verknüpft über die N-terminale α-Aminogruppe, entstehen beispielsweise an dem E3-Komplex LUBAC (*linear ubiquitin chain assembly complex*) [46] und stehen in Verbindung mit Antworten des adaptiven Immunsystems [47]. In Hefe zählen K48- (29 %), K11- (28 %) und K63-verknüpfte Ketten (16 %) zu den am häufigsten generierten Polyubiquitinsignalen [48]. Verknüpfungen über K11 werden im Zuge der Regulation des Zellzyklus gebildet [49]. K63-Polyubiquitinierungen sind an der DNS-Reparatur, Endozytose, dem Transport von Membranproteinen und der zellulären Signaltransduktion beteiligt [8]. Ubiquitinketten, die über K48 verknüpft sind (K48-Ketten), regulieren die Stabilität von Proteinen in der Zelle (1.5) [22,50]. Polypeptide mit dieser Markierung werden selektiv durch proteasomale Proteolyse entfernt (1.8).

## 1.4 Proteinabbau und Proteinqualitätskontrolle

Das Proteom einer Zelle passt sich dynamisch an intrazelluläre Anforderungen und extrazelluläre Bedingungen an und sichert eine störungsfreie Entwicklung und das Überleben der Zelle. Die Proteinhomöostase wird nicht nur durch die Synthese, die Faltung und den Transport sondern ebenso durch den Abbau von Polypeptiden aufrechterhalten [51]. Einerseits werden Proteine aus regulatorischen Gründen gespalten, wodurch deren Aktivitäten gesteuert werden. Dabei können Zielproteine proteolytisch aktiviert oder zerstört werden. Zum anderen gewährleistet eine selektive Beseitigung von defekten Proteinen die Integrität des Proteoms. Die Faltung eines Proteins definiert seine Funktion. Eine Anhäufung fehlgefalteter Proteine ist aufgrund des Funktionsverlustes und der Neigung, Aggregate zu bilden, toxisch für Zellen und kann Grundlage schwerwiegender Krankheiten sein [52]. Fehlfaltungen treten bei etwa 30 % aller synthetisierten Polypeptide auf [53] und werden durch unterschiedlichste Faktoren wie reaktionsfreudige Verbindungen, hochenergetische Strahlung, genetische Mutationen oder einer fehlerhaften Translation ausgelöst [54]. Die zelluläre Proteinqualitätskontrolle begegnet nicht-nativen Proteinen mit zwei unterschiedlichen Strategien. Wiederholte Reifungsversuche werden durch sogenannte Chaperone unterstützt. Diese Faltungshelfer erkennen hydrophobe Bereiche, die von fehlgefalteten Proteinen exponiert werden, und entfalten die gebundenen Polypeptide ATP-abhängig für erneute Versuche, die korrekte Raumstruktur einzunehmen [55,56]. Terminal fehlgefaltete Proteine, die ihre native Konformation nicht annehmen können, werden gezielt erkannt und zerstört.

Der intrazelluläre Abbau von Proteinen geschieht entweder über Autophagie oder das Ubiquitin-Proteasom-System. Beide Abbauwege prozessieren Substratproteine mit unterschiedlicher Selektivität und koordinieren proteolytische Aktivitäten. In Hefe werden nicht essentielle Zellbestandteile verdaut, um einem Mangel an Nährstoffen zu begegnen [57]. Große Proteinkomplexe sogar ganze Organellen werden von Doppelmembranen umschlossen und nach Fusion dieser Autophagosomen mit der Vakuole hydrolytisch zersetzt. Als Antwort auf eine Nährstoffunterversorgung ist die Autophagie ein Abbauprozess mit geringer Selektivität. Hingegen werden beschädigte Mitochondrien, eine Quelle reaktiver Sauerstoffspezies, zielgerichtet entfernt. Atg32 wird als Organellmarkierung für Mitophagie in die äußere mitochondriale Membran lokalisiert und vermittelt durch eine Wechselwirkung mit den Autophagiefaktoren Atg8 und Atg11 die Inkorporation in Mitophagosomen [58,59]. Wie bereits erwähnt, ist Atg8 strukturell ähnlich zu Ubiquitin und notwendig für den Aufbau von autophagosomalen Membranen [60]. Erst kürzlich wurde eine neue Klasse von

Ubiquitin-ATG8 Adaptern in Hefe entdeckt, die über eine UBD (CUE-Domäne) mit Ubiquitinkonjugaten interagieren [61,62]. Ubiquitinierte Proteine können durch spezifische Schnittstellen beider Systeme auch autophagosomal abgebaut werden.

### 1.5 Ubiquitin-Proteasom-System, ER-assoziierter Proteinabbau und *unfolded protein response*

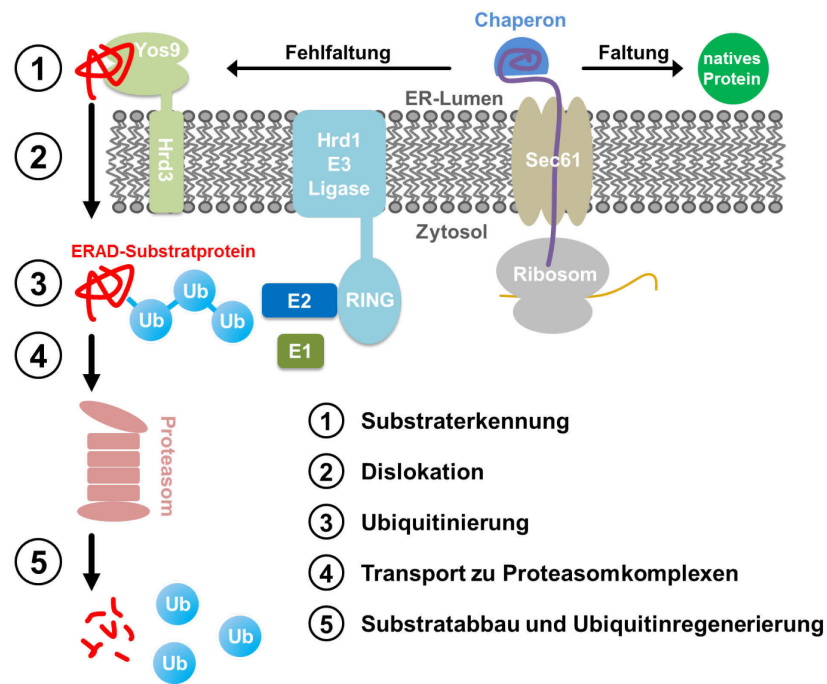
K48-polyubiquitinierte Proteine werden hauptsächlich durch 26S-Proteasomen abgebaut. Zielproteine des Ubiquitin-Proteasom-Systems befinden sich kompartimentiert im Zytosol, im Zellkern, in den Mitochondrien und dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und werden aus regulatorischen oder Gründen der Qualitätskontrolle von spezifischen Ubiquitinligasen markiert [22].

Der Zellzyklus ist strikt reguliert und beruht auf einer präzisen Koordination seiner Protagonisten durch einen gezielten Proteinabbau. Der nukleäre APC/C-Komplex (*anaphase promoting complex/cyclosome*) ist mit 13 Untereinheiten eine der am komplexesten zusammengesetzten E3-Ubiquitinligasen. Der modulare Aufbau gewährleistet eine differentielle Markierung von verschiedenen Taktgebern des Zellzyklus wie Cyclinen oder Securin. Gemäß eines fortschreitenden Zellzyklusprogrammes wird die Aktivität der Ubiquitinligase durch Inhibitoren, Aktivatoren und Phosphorylierungen reguliert [63]. Neben der Stimulation des E3-Enzyms selektieren die Aktivatoren gleichzeitig Substratproteine und werden nach Dissoziation selbst für den Abbau gekennzeichnet.

Im Rahmen der Proteinqualitätskontrolle ist die Substraterkennung eng mit Chaperonen verbunden. Beispielsweise interagieren Hsp70-Chaperone mit der zytosolischen Ubiquitinligase CHIP [64] oder der Untereinheit Hrd3 des ER-membranständigen HRD-Ubiquitinligase-Komplexes (*HMG-coA reductase degradation*) [65]. Fehlgefaltete Proteine im Lumen oder in der ER-Membran werden durch einen speziellen Abbauweg selektiv erkannt, in das Zytosol exportiert und anschließend für den proteasomalen Abbau ubiquitiniert.

Etwa 30 % aller im menschlichen Genom kodierten Proteine können dem sekretorischen Weg zugeordnet werden [66]. Vermittelt durch ein ER-Signalpeptid am N-Terminus der entstehenden Polypeptide lokalisieren Ribosomen an die ER-Membran, woraufhin die Proteine über das Sec61-Translokon in das Lumen synthetisiert werden. Kotranslational werden vorgefertigte Oligosaccharidmoleküle auf die naszierende Kette übertragen, die durch ihren hydrophilen Charakter die Proteinfaltung unterstützen und während des

Reifungsvorgangs prozessiert werden. Chaperone wie Kar2, Disulfidisomerasen und Peptidyl-Prolyl-Isomerasen fördern den Faltungsprozess. Native Proteine verlassen über Vesikel das ER in Richtung Golgi-Apparat und erreichen nach weiteren posttranslationalen Modifikationen ihre endgültigen Bestimmungsorte. Diese können Endosomen, Lysosomen oder die Plasmamembran sein, oder das Protein wird extrazellulär sezerniert. Irreversibel fehlgefaltete Proteine werden zu Substraten des ER-assoziierten Proteinabbaus (*ER-associated protein degradation*, ERAD, Abbildung 1-5), ein hochkonservierter Abbauweg von Polypeptiden in allen Eukaryontenzellen [50]. Hrd3 und das Lektin Yos9 erkennen freiliegende hydrophobe Bereiche in Kombination mit einer bestimmten Glykanstruktur und rekrutieren aberrante Proteine an den HRD-Ubiquitinligasekomplex. Ein weiteres ERAD-E3-Enzym ist Doa10. Beide RING-Ubiquitinligasen katalysieren die Markierung unterschiedlicher Substrate in Hefe je nach Position der Läsion [67,68]. Proteine mit defekten zytosolischen Domänen werden von Doa10 (*Degradation of alpha factor*) gekennzeichnet (ERAD-C). Neben der Ubiquitinierung von fehlgefalteten Proteinen vermittelt Doa10 den regulatorischen Abbau des *Mat alpha*-Faktors, der den Paarungstyp von haploiden Hefen definiert. Polypeptide, die strukturelle Defekte in Transmembranbereichen (ERAD-M) oder in ER-luminalen Domänen (ERAD-L) aufweisen, werden durch den HRD-Ubiquitinligasekomplex gekennzeichnet [69,70]. Zusätzlich nimmt das E3-Enzym eine regulatorische Funktion ein und markiert die HMG-CoA-Reduktase, wodurch ERAD und der Sterolmetabolismus verknüpft werden. Hrd1 ist mit sechs Transmembranbereichen in der ER-Membran verankert und trägt eine C-terminale, zytosolische RING-Domäne. Ohne den Substratrezeptor Hrd3 autoubiquitiniert sich die Ubiquitinligase und wird dem Proteasom zugeführt [71,72]. Für den Abbau membranständiger Substrate oligomerisiert Hrd1 vermittelt durch Usa1 [73]. Das ebenfalls membranständige Der1 wird durch eine Wechselwirkung mit dem C-Terminus von Usa1 in den Komplex integriert und ist an der Markierung von ER-luminalen Zielproteinen beteiligt [67,74]. Der1 scheint an der Dislokation von fehlgefalteten Proteinen in das Zytosol beteiligt zu sein [75]. Es ist anzunehmen, dass der multimere HRD-Komplex einen Kanal in der ER-Membran bildet und somit ERAD-Substrate an die zytosolische RING-Domäne dirigiert. Das E2-Enzym Ubc7, welches von seinem Kofaktor Cue1 an die ER-Membran rekrutiert [76] und aktiviert wird [77], assembliert sowohl mit Hrd1 als auch Doa10 K48-verknüpfte Polyubiquitinketten. Die einzelnen Untereinheiten des modular aufgebauten HRD-Komplexes erfüllen unterschiedliche Funktionen während der Ubiquitinierung von Zielproteinen (Substraterkennung, Dislokation, Ubiquitinierung) und bilden eine *multi-subunit*-E3-Ubiquitinligase.



**Abbildung 1-5: Das Ubiquitin-Proteasom-System ist beteiligt an der Proteinqualitätskontrolle im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und führt zu einem ER-assoziierten Proteinabbau (ERAD).** Proteine des sekretorischen Weges werden kotranslational durch den Sec61-Komplex in das ER-Lumen synthetisiert. Eine Batterie von Faltungshelfern (Chaperone) unterstützt die ungefalteten Polypeptide, ihre native Konformation zu gewinnen. Ist die Reifung erfolgreich, gelangen die nativen Proteine zu ihren vorgesehenen Wirkungsorten. Treten irreversible Fehlfaltungen auf, so werden die anormale Proteine selektiv von ERAD-Komponenten erkannt (Hrd3, Yos9) ① und in das Zytosol exportiert ②. Dort werden die Substrate durch die Ubiquitinierungskaskade von E1, E2 (Cue1/Ubc7) und E3 (Hrd1 oder Doa10) K48-abhängig polyubiquitiniert und vermittelt durch Adapterproteine ④ dem proteasomalen Abbau zugeführt. In diesem Zusammenhang werden fehlgefaltete Proteine deubiquitiniert und proteolytisch zersetzt ⑤.

Membranständiges Ubx2 bringt Cdc48 an den E3-Komplex. Die AAA-ATPase bindet ubiquitinierte Proteine über ERAD-spezifische Kofaktoren (Npl4/Ufd1) [78,79] (Abbildung 1-6). Unter ATP-Spaltung und konformationellen Veränderungen löst der Cdc48-Komplex Substratproteine von der Membran und scheint damit deren Dislokation zu unterstützen [80,81]. Im Zytosol übernehmen Adapterproteine den gerichteten Transport von Substratproteinen zu den Proteasomen [82]. Die Proteine Rad23 und Dsk2 verfügen einerseits über ubiquitinbindende UBA-(*ubiquitin associated*) Domänen, die Ubiquitinkonjugate fixieren, und andererseits über UBL-Domänen, welche mit proteasomalen Rezeptoren (Rpn1/Rpn2) wechselwirken. Die Adapter binden präferentiell längere K48-Ubiquitinketten, die als Abbau-signal von ERAD-E2/E3-Systemen assembliert werden [82]. Am Proteasom werden die Ubiquitinmarkierungen durch assoziierte Deubiquitinasen (Ubp6, Rpn11) entfernt, die

Substratproteine ATP-abhängig am regulatorischen Partikel (*regulatory particle*) entfaltet und in der Kammer des Kernpartikels (*core particle*) proteolytisch zersetzt (1.8).

Die Proteinqualitätskontrolle des ER sondert fehlgefaltete Proteine aus, deren Weitertransport in den Golgi-Apparat verhindert ist, und sichert die Faltungskapazität im ER. Unter zellulären Stressbedingungen ereignen sich vermehrt Proteinfehlfaltungen. Eine Anhäufung von Substraten kann das ERAD-System überlasten und aktiviert den UPR-Signalweg (*unfolded protein response*). Durch gesteigerte Mengen an Chaperonen, Proteasen und ERAD-Ubiquitinligasen versucht die Zelle die Proteinfaltungshomöostase wiederherzustellen [83]. In höheren Eukaryonten existieren drei ER-Stress Sensoren Ire1, ATF6 und PERK, welche die Expression von UPR-Zielgenen erhöhen [84]. Der Signalweg ist in Hefe stark konserviert und beschränkt sich auf das Membranprotein Ire1, das eine mit Kar2 assoziierte ER-luminale und eine zytosolische Domäne mit Kinase- und RNase-Aktivität enthält. Letztere entfernt in einem unkonventionellen Spleißvorgang ein Intron der Hac1-mRNA und der entstehende Transkriptionsfaktor Hac1 interagiert mit speziellen Zielsequenzen der DNS, sogenannte UPR *response elements*. Ist die Expression der UPR-Zielgene nicht ausreichend, um die Proteinhomöostase wiederherzustellen, kann die Zelle bei längerer Induktion des UPR in die Apoptose übergehen [85].

## 1.6 Verschiedene E2/E3-Systeme im Vergleich

Proteine werden entweder mit einzelnen Ubiquitineinheiten oder mit Ubiquitinketten markiert. Die Polymere unterscheiden sich in der Art der Verknüpfung und der Anzahl der Monomere. Die Länge des Ubiquitinsignals wird durch das Substrat, das E2-, E3-Enzym und durch DUBs beeinflusst. Welche Lysinreste von Ubiquitin während der Kettensynthese verbunden werden, ist meist durch das E2 definiert [22].

Entsprechend einer hierarchisch aufgebauten Ubiquitinierungskaskade wechselwirken viele E2-Enzyme mit mehreren E3-Ubiquitinligasen. Ubc2 (Rad6) ist ein E2, das sowohl Mono- als auch Polyubiquitinierungen katalysiert und damit unterschiedliche Strategien bei der Reparatur von DNS-Schäden festlegt [31]. In Zusammenarbeit mit der Ubiquitinligase Rad18 monoubiquitiniert Ubc2 PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), ein Ringklemmenprotein, das für eine prozessive DNS-Replikation sorgt. Die Markierung führt zur Rekrutierung einer alternativen Polymerase, die weniger anfällig ist, bei Fehlpaarungen zu blockieren und gewährleistet somit eine kontinuierliche Verdopplung der DNS (*translesion synthesis*). Abweichend dazu wird bei einer Polyubiquitinierung durch Ubc13/Uev1a mit dem E3 Rad5

die beschädigte Stelle in der DNS umgangen, indem der Einzelstrang, der als Matrize dient, gewechselt wird (*template switching*). Weiter ist Ubc2 mit dem E3 Ubr1 und einer Polyubiquitinierungsaktivität am Proteinabbau nach der N-Enden Regel (*N-end rule*) beteiligt [86,87]. Hier wirken N-terminale Aminosäuren mit basischem oder aromatischem Charakter als konserviertes Abbausignal. Die betroffenen Proteine werden spezifisch erkannt, polyubiquitiniert und dem Proteasom zugeführt. Das E2-Enzym agiert auch im Zellkern zusammen mit der E3-Ubiquitinligase Bre1. Das Substrat Histon H2B wird monoubiquitiniert, wodurch eine transkriptionelle Aktivierung erzielt wird [88].

Akteure der postreplikativen DNS-Reparatur werden unter anderem durch K63-verknüpfte Polyubiquitinsignale an die geschädigte DNS-Sequenz (z.B. Doppelstrangbruch) rekrutiert. Das E2 Ubc13 wird bei der Polyubiquitinierung von Histon 2A zusammen mit der E3-Ubiquitinligase RNF8 von einem zweiten, inaktiven E2 unterstützt. Als Heterodimer mit Ubc13 positioniert Uev1a (*ubiquitin conjugating enzyme variant 1a*) das Akzeptorubiquitin für eine Verknüpfung der Ubiquitinmoleküle über K63 [89,90]. Auch bei K11-Polyubiquitinierungen durch das E2 Ube2S ist eine ubiquitinbindende Region des E2-Enzyms für eine selektive Kettenverknüpfung notwendig [91].

Der SCF- und APC- Komplex sind modular zusammengesetzte RING-Ubiquitinligasen mit vielen Untereinheiten. Beide E3-Enzyme sind unter anderem im Zellzyklus involviert und markieren dessen Regulatoren wie die Cycline. APC kontrolliert den Übergang von der Meta- zur Anaphase, indem die Ligase den Proteaseinhibitor Securin polyubiquitiniert, wodurch dieser proteasomal abgebaut wird [92,93]. Securin blockiert die Aktivität des Enzyms Separase, das Cohesin Scc1 spaltet. Cohesine sind Strukturproteine an Centromeren von Chromosomen und verbinden die zwei Schwesterchromatiden. Wird die Protease aktiviert, trennen sich die in der Äquatorialebene ausgerichteten Schwesterchromatiden und bewegen sich in der Anaphase zu den entgegengesetzten Zellpolen [94]. Am APC assemblieren zwei E2-Enzyme sequentiell Ubiquitinketten. Ubc4 markiert Substratproteine zuerst mit Monoubiquitin, welches von Ubc1 zu Polyubiquitin verlängert wird. Ubc1 enthält eine ubiquitinbindende Domäne, die entscheidend für die Prozessivität des E2-Enzyms ist [95]. Der SCF-Komplex (*SKP1/Cullin/F-Box*) steuert durch Ubiquitinierung eines Inhibitors (Sic1) einer cyclin-abhängigen Kinase den Eintritt in die S-Phase [96] und reguliert die Zellantwort bei einer Unterversorgung von Nährstoffen [22,97]. Im SCF-Komplex ist hauptsächlich das K48-abhängige E2-Enzym Cdc34 aktiv, dessen C-terminale, ubiquitinbindende Region die Polyubiquitinierung fördert [98].

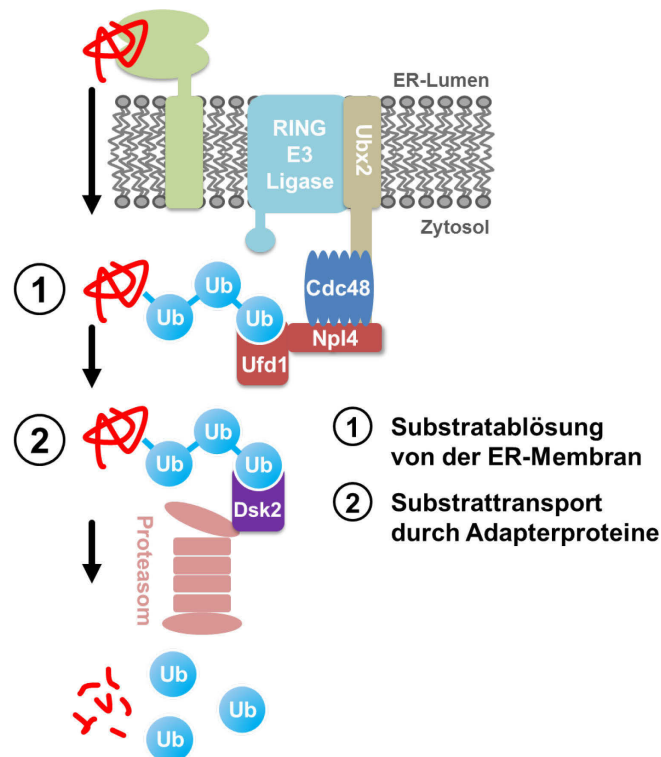


Das E2 Ubc7 ist durch seinen Kofaktor Cue1 (*coupling of ubiquitin conjugation to endoplasmic reticulum degradation*) membrangebunden und agiert mit den Ubiquitinligasen Doa10 und Hrd1 an der ER-Membran und mit den Asi-RING-Ubiquitinligasen an der inneren Kernmembran [22,99,100]. Cue1 besitzt eine ubiquitinbindende CUE-Domäne, die die Synthese von K48-Ubiquitinketten stimuliert [99].

## 1.7 Ubiquitinbindende Domänen

Ubiquitinbindende Domänen (UBD) sind strukturelle Elemente in Proteinen, die nicht-kovalent mit Ubiquitinmolekülen wechselwirken und in 20 Proteinfamilien gruppiert sind [39,101,102]. Die stark abweichenden Strukturen der Domänen spiegeln unterschiedliche Bindungsmodi mit Ubiquitin und dessen Polymeren wider [9,39]. Am häufigsten wird die posttranslationale Modifikation durch  $\alpha$ -helikale Faltungen erkannt, die mit dem hydrophoben Bindungsbereich um Ile44 von Ubiquitin wechselwirken. Die Interaktion von UBA- und CUE-Domänen mit Ubiquitin findet über zwei unterbrochene Helices einer *three-helix bundle* Faltung statt. Dagegen sind UIMs (*ubiquitin interacting motif*) und MIUs (*motif interacting with ubiquitin*) in einfachen  $\alpha$ -Helices zu finden, die in gegensätzlicher Orientierung zu dem Ubiquitinmolekül binden. Bemerkenswert sind Helices mit DUIMs (*double-sided UIM*), die ein doppeltes Bindungsmotiv beinhalten und zwei Ubiquitinmoleküle gleichzeitig erkennen. Zinkfingerproteine sind die zweitgrößte Gruppe von UBDs und in Struktur, Ubiquitinerkennung und Bindungsstärke am abwechslungsreichsten. Das Adapterprotein Npl4 bindet mit einer NZF-Domäne (Npl4-Zinkfinger) an die Ile44-Region [79] und rekrutiert polyubiquitinierte Substrate an den Cdc48-Komplex. Zinkfingerdomänen können neben der hydrophoben Bindungsstelle um Ile44 mit zwei weiteren Bereichen der Ubiquitinoberfläche um Asp58 und Gly78 wechselwirken [8]. Wie bereits erwähnt, wird PCNA bei DNS-Schädigungen monoubiquitiniert. Die Markierung bewirkt, dass eine alternative Polymerase mittels UBM (*ubiquitin binding motif*) an die ubiquitinierte Ringklemme bindet und so an die Replikationsgabel rekrutiert wird. UBMs assoziieren mit Ubiquitin in der Umgebung von Leu8 unabhängig von Position Ile44 und tragen ein charakteristisches Leucin-Prolin-Paar in einer meist helikalen Faltung [103]. E2-Enzyme orientieren das thioestergebundene Donor-ubiquitin mithilfe einer speziellen UBD, einer sogenannten Ubiquitin-konjugierenden Domäne (Ubc-Domäne) für eine spezifische Verknüpfungsreaktion [23]. Der Ubc-Domäne von Uev1a fehlt das katalytisch aktive Cystein. Diese E2-Variante positioniert daher nur

Akzeptorubiquitineinheiten (über Ile44) während der K63-Polyubiquitinierung zusammen mit Ubc13 [89].



**Abbildung 1-6: Eine bekannte Funktion von ubiquitinbindenden Domänen (UBD) in ERAD ist die Erkennung von K48-polyubiquitinierten Substratproteinen, die proteasomal abgebaut werden sollen.** Direkt nach dem Export in das Zytosol werden die selektierten Proteine mit K48-verknüpften Polyubiquitinketten markiert. Fortan gewährleisten UBDs von ERAD-Komponenten den gerichteten Transport der fehlerhaften Proteine zu den Proteasomen. In einem Cdc48-abhängigen Schritt werden Substrate unter Verbrauch von ATP von dem Ubiquitinligasekomplex gelöst. Die AAA-ATPase wird von Ubx2 an die ER-Membran rekrutiert und bindet über die ERAD-spezifischen Kofaktoren Ufd1/Npl4 polyubiquitinierte Proteine. Den Transport zu den Proteasomkomplexen übernehmen Adapterproteine (Rad23, Dsk2), die einerseits mit Substraten über UBA-Domänen wechselwirken und andererseits UBL-Domänen verwenden, um mit den Rezeptoren des Proteasoms zu assoziieren. Die meisten UBDs, die in ERAD involviert sind, interagieren präferentiell mit K48-verknüpften Ubiquitinketten.

Verschiedenartig verknüpfte Ubiquitinketten können durch eine Kombination mehrerer UBDs oder durch spezielle Bindungsmodi einzelner Domänen mit den Verknüpfungsbereichen des Polymers unterschieden werden [40]. Das Effektorprotein Rap80 bindet mit zwei UBDs spezifisch K63-Ubiquitinketten, die von Ubc13 auf Histon 2A assembliert werden, und rekrutiert im Zuge der Regulation der DNS-Reparatur eine weitere E3-Ubiquitinligase (BRAC1) [104]. Die Länge der verbindenden Region (*linker*) zwischen den beiden UIMs sichert eine spezifische Bindung von K63-Ketten, nicht aber von K48-verknüpften

Ubiquitineinheiten [105,106]. Das Adapterprotein Rad23 selektiert über eine UBA-Domäne K48-polyubiquitinierte Substrate für deren Transport zu den Proteasomen. Die Domäne platziert sich zwischen zwei verknüpfte Ubiquitinmoleküle der Kette und bindet sowohl die distale als auch proximale Einheit. Die Anordnung der an der Bindung beteiligten Helices ist passgenau an der Kettenkonformation bei K48-Verknüpfung ausgerichtet [107]. Am Proteasom interagieren UIM- und PH-Domänen (*pleckstrin homology*) der Ubiquitinrezeptoren Rpn10 [108,109] und Rpn13 [110] mit Polyubiquitinketten und führen die markierten Proteine zur gezielten Proteolyse.

Die Bindungsaffinitäten einzelner UBDs zu Monoubiquitin sind allgemein gering ( $K_D$  im mikromolaren Bereich) [39]. Ubiquitinketten ermöglichen multivalente Bindungen, die zu einer Anreicherung von UBDs an den Polymeren führen und somit die funktionelle Affinität erhöhen. Bei einer spezifischen Erkennung von Ubiquitinketten ist die Wechselwirkung meist durch eine vergrößerte Bindungsoberfläche oder durch multiple UBDs verstärkt [40].

Ubiquitinbindende Domänen führen Effektorproteine zu ubiquitinierten Substraten, die gemäß der jeweiligen Markierung prozessiert werden. Während ERAD werden K48-polyubiquitinierte Polypeptide selektiv von Adapterproteinen (Ufd1, Rad23, Dsk2) gebunden und an die Proteasomen weitergeleitet um abgebaut zu werden (Abbildung 1-6). Doch UBDs dekodieren nicht nur Ubiquitinsignale, sondern sind auch maßgeblich am Aufbau von Ubiquitinketten beteiligt (2.1.8 bis 2.1.8.9). Bindungsereignisse mit Ubiquitineinheiten beschleunigen Polyubiquitinierungsreaktionen und gewährleisten eine spezifische Verknüpfung der Monomere.

## 1.8 Das Proteasom und assoziierte Deubiquitinasen

Proteine, die mit K48-verknüpftem Polyubiquitin gekennzeichnet sind, werden unter Spaltung von ATP in einem großen Proteasekomplex, dem 26S-Proteasom, abgebaut. Die Substrate werden proteolytisch in Peptide zersetzt, und die konjugierten Ubiquitinketten in Monomere zerlegt. Das in allen Eukaryonten hochkonservierte Proteasom setzt sich aus zwei funktionellen Subkomplexen zusammen, dem regulatorischen Partikel (*regulatory particle*, RP) und dem Kernpartikel (*core particle*, CP). Zu den wichtigsten Komponenten des ringförmigen 19S-RP zählen AAA-ATPasen (Rpt1-6), Ubiquitinrezeptoren (Rpn10/Rpn13), Rezeptoren für weitere Faktoren (Rpn1/Rpn2) und Deubiquitinasen (Rpn11/Ubp6) bzw. E4-Ubiquitinligasen (Hul5). Ubiquitinierte Polypeptide gelangen über Adapterproteine (Dsk2/Rab23) an den proteasomalen Komplex und werden von Ubiquitinrezeptoren des ringförmigen RP gebunden.

Ubiquitinketten können durch assoziierte E4-Ubiquitinligasen und Deubiquitinasen weiter prozessiert oder entfernt werden. Neben dem Ubiquitinsignal ist eine unstrukturierte Region in Substratproteinen notwendig (*proteasome initiation region*), um die Entfaltung von Proteinen einzuleiten [111]. Hierzu werden Substrate kraft ATP-abhängiger, konformationeller Umgestaltungen durch einen engen Kanal des RP-Ringes in das Innere des proteolytisch aktiven Kernpartikels geschleust. Die Öffnung dieses Einlasses ist strikt reguliert und gewährleistet einen gezielten intrazellulären Proteinabbau [112]. Das Kernpartikel übt die proteolytische Aktivität aus und formt eine zylindrische Struktur, bestehend aus vier gestapelten Ringuntereinheiten. Die äußeren  $\alpha$ -Ringe dienen als Plattform für die Wechselwirkung mit dem RP und steuern den Substratzugang in die Kammer des CP [113]. Von den inneren  $\beta$ -Ringen ragen proteolytisch aktive Threoninreste in den Hohlraum des Zylinders, die mit unterschiedlicher Spezifität Peptidbindungen der Substratproteine spalten [114].

Die deubiquitinierende Aktivität des Proteasoms befindet sich in einem Unterkomplex, der als Deckel (*lid*) des RP bezeichnet wird. Die Untereinheit Rpn11 ist eine Metalloprotease, die Ubiquitinketten am Ansatz der Verknüpfung mit dem Substrat kappt [115,116]. Anscheinend ist die Isopeptidaseaktivität mit der ATP-Spaltung von nahe gelegenen Rpt-Untereinheiten gekoppelt [117]. Die Deubiquitinierung wiederum scheint die Proteolyse von Zielproteinen zu unterstützen [115,118]. Ein weiteres mit dem Proteasom assoziiertes DUB ist Ubp6 (*ubiquitin specific processing protease 6*). Diese Cysteinprotease ist ATP-unabhängig und liegt entfernt von dem Substrateinlass des RP [117]. Ubp6 beeinflusst den Übergang von Polypeptiden in den Kanal [119] und hemmt durch eine Verkürzung von Ubiquitinketten den Proteinabbau [116,120]. Beide DUBs verhindern den proteasomalen Abbau von Ubiquitinmolekülen zusammen mit Substratproteinen und regenerieren Monoubiquitin für erneute Markierungsreaktionen.

## 1.9 Zielsetzung der Arbeit

Ubiquitinsignale sind dynamische Proteinmarkierungen, die von ubiquitinierenden und deubiquitinierenden Enzymen gestaltet werden. Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines kontinuierlichen Messverfahrens für die Untersuchung der Kinetiken von Ubiquitinierungs- und Deubiquitinierungsreaktionen. Der Auf- und Abbau von Ubiquitinketten soll *in vitro* mittels Fluoreszenzmessungen verfolgt und die Reaktionen quantifiziert werden.

Im Rahmen der Proteinqualitätskontrolle ist eine Proteinmarkierung mit einzelnen Ubiquitinmolekülen meist nicht ausreichend, die Proteolyse des Substrates auszulösen. Eine schnelle

und effiziente Polyubiquitinierungsreaktion ist entscheidend für die Entstehung des Ubiquitinsignals und die daraus resultierende Konsequenz für das Zielprotein. Das ERAD-E2 Ubc7 assembliert zusammen mit seinem Kofaktor Cue1 Polyubiquitinketten. Der stimulierende Effekt der ubiquitinbindenden CUE-Domäne von Cue1 soll mittels Fluoreszenzmessungen mechanistisch aufgeklärt werden. Anstatt der üblichen Polyubiquitinierungsreaktionen mit einer Vielzahl von unterschiedlich ablaufenden Ubiquitinkonjugationen sollen die einzelnen Verlängerungsschritte der Synthese von Ubiquitinketten untersucht werden.

Für ein vollständiges Verständnis der Organisation von Ubiquitinsignalen ist zusätzlich die funktionelle Charakterisierung von Deubiquitinasen erforderlich. Anhand der proteasomalen DUBs Rpn11 und Ubp6 soll gezeigt werden, dass auch der Kettenabbau mittels Fluoreszenzmessungen analysiert werden kann.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Fluoreszenz-basierte Untersuchungen von *in vitro* Ubiquitinierungsreaktionen

Zellen stellen als kleinste lebende Einheiten eigenständige Systeme dar, die mit einem ausgedehnten, regulatorischen Netzwerk ihre Selbsterhaltung sichern. Eine universelle Herangehensweise der Wissenschaft liegt darin, die Komplexität solcher Ordnungen aufzulösen, indem einzelne funktionelle Einheiten charakterisiert werden. Neben der Substraterkennung oder dem proteasomalen Abbau stellt die Markierungsreaktion mit Ubiquitin einen entscheidenden Schritt in ERAD dar. ERAD ist wiederum im größeren Zusammenhang der Proteinqualitätskontrolle untergeordnet, die ein funktionierendes Proteom sicherstellt.

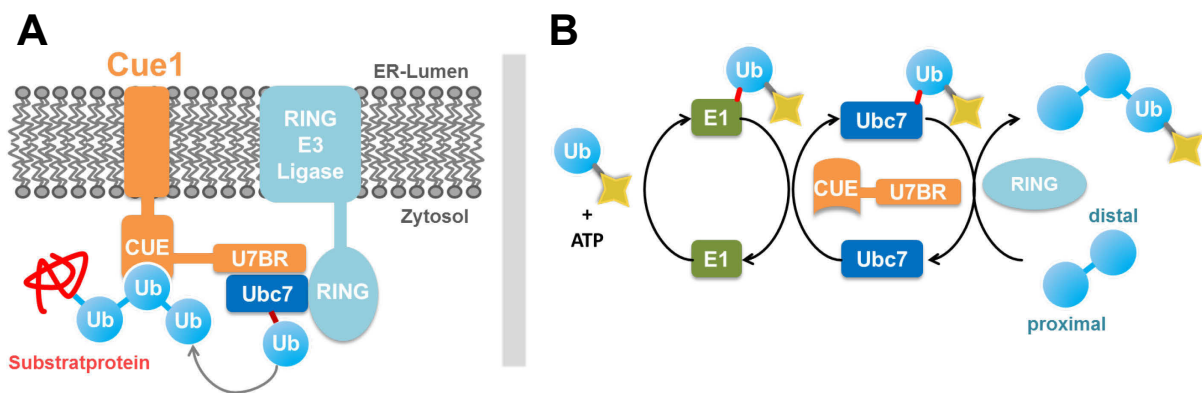
*In vitro* Experimente bieten die Möglichkeit funktionelle Systeme isoliert zu untersuchen. Die enzymatische Kaskade von E1, E2 und E3 kann unter definierten Bedingungen *in vitro* rekonstituiert werden. Die Ubiquitinierungsreaktionen können entsprechend den aufkommenden Fragestellungen angepasst werden, um molekulare Einblicke in die Funktion einzelner Komponenten im Prozess der Ubiquitinierung zu gewinnen. Fluoreszenzmarkiertes Ubiquitin wird eingesetzt, um den Aufbau von Ubiquitinketten zu verfolgen.

#### 2.1.1 *In vitro* Ubiquitinierungsreaktionen mit cCue1 und Ubc7

In den kommenden Kapiteln werden Fluoreszenz-basierte Methoden vorgestellt, die exemplarisch Ubc7 und dessen Kofaktor Cue1 untersuchen. Das E2-Enzym polyubiquitiniert K48-abhängig Substratproteine zusammen mit der Hrd1-, Doa10- und Asi-RING-Ubiquitinligase. Cue1 ist ER-membranständig und verfügt über zwei weitere funktionelle Domänen (Abbildung 2-1 A). Die Ubc7-bindende Region (U7BR) rekrutiert Ubc7 an die Membran und steigert durch konformationelle Veränderungen innerhalb des E2-Enzyms dessen Aktivität [76,77]. Die zweite Domäne ist eine ubiquitinbindende CUE-Domäne, die mit Polyubiquitinketten wechselwirkt und deren Aufbau durch Ubc7 stimuliert [99]. Der Mechanismus der CUE-Domänen assistierten Polyubiquitinierungsreaktion ist bisher unbekannt und steht im Fokus dieser Arbeit.

Die *in vitro* Experimente der membranständigen Ubiquitinierung beschränken sich auf die zytosolischen Fragmente der beteiligten ERAD-Komponenten (Abbildung 2-1 B). Neben dem E1-Enzym und Ubc7 beinhalten die Reaktionen ein Cue1-Fragment ohne Transmembran-

Domäne (Aminosäure 24-203 alias cCue1) und optional einen C-terminalen Teil von Hrd1 (Aminosäure 325-551 alias cHrd1), der die RING-Domäne enthält. Ubc7 assembliert *in vitro* ausgehend von den Ubiquitinmonomeren freie, ungebundene Ubiquitinketten (*de novo* Kettenbildung) [99]. Der Einfluss der Ubiquitinbindung auf die Ubiquitinierung wurde mithilfe einer Cue1-Variante untersucht, deren CUE-Domäne durch drei Aminosäureaustausche (L76R, A77G, P78A) ungefaltet ist (mittels NMR in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dötsch validiert; Daten nicht gezeigt) und nicht mehr mit Ubiquitin wechselwirkt [99]. Durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Ubiquitinmolekülen können der Aufbau von Ubiquitinketten direkt verfolgt und die Reaktionskinetiken quantifiziert werden.



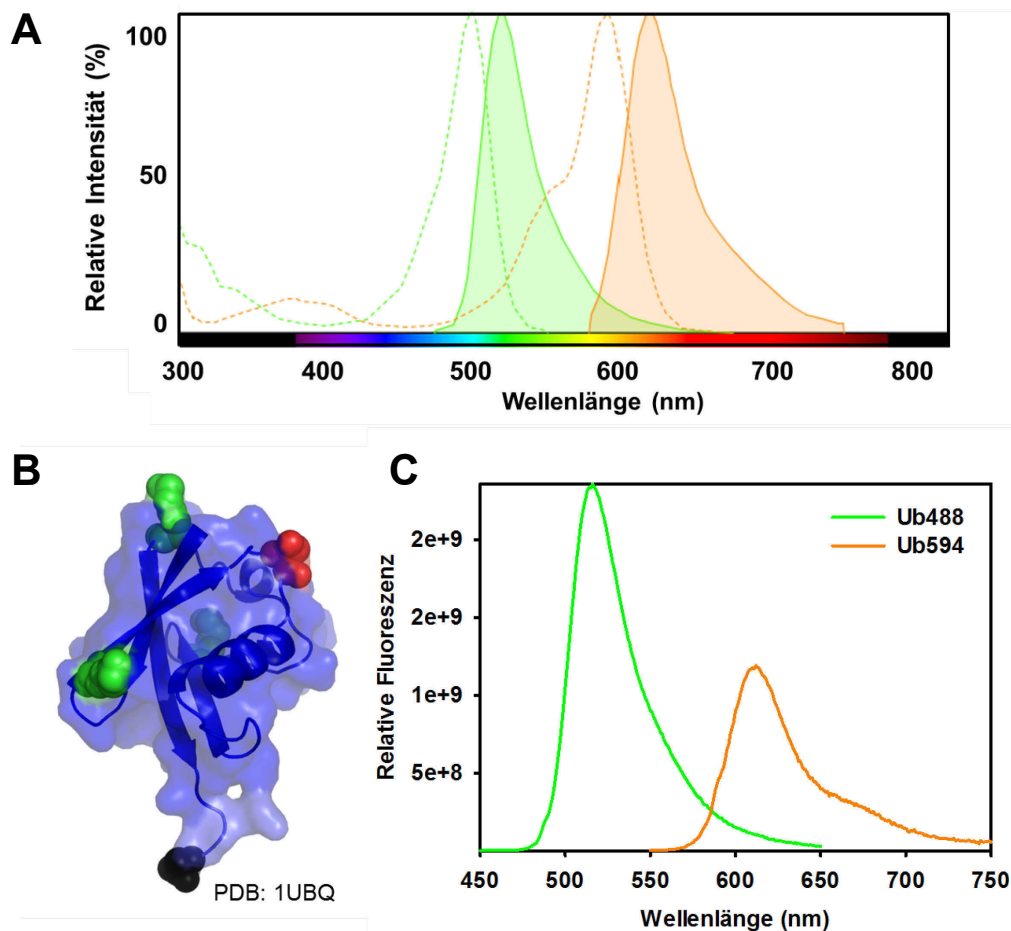
**Abbildung 2-1: Schematische Darstellung einer Ubiquitinierungsreaktion, die durch Cue1/Ubc7 und einer ERAD-RING-E3-Ubiquitinligase *in vivo* (A) und *in vitro* (B) katalysiert wird.** (A) Cue1 ist ER-membranständig und verfügt über zwei weitere funktionelle Domänen. Die Ubc7-bindende Region (U7BR) rekrutiert Ubc7 an die ER-membran und aktiviert das E2-Enzym. Die CUE-Domäne bindet Ubiquitinketten und stimuliert die Polyubiquitinierung durch Ubc7. Cue1 und Ubc7 markieren zusammen mit einer RING-E3-Ubiquitinligase Substratproteine mit K48-verknüpften Polyubiquitinketten. (B) *In vitro* Ubiquitinierungsreaktionen beinhalten E1, Ubc7, ein zytosolisches Fragment von Cue1 (cCue1), optional die RING-Domäne der Hrd1-Ubiquitinligase (cHrd1) und Ubiquitin. Die Fluoreszenzmarkierung von Ubiquitin ermöglicht eine quantitative Untersuchung der Synthese von Ubiquitinketten.

### 2.1.2 Fluoreszenzmarkierung von Ubiquitinmolekülen

Ubiquitin enthält keine Cysteinaminosäuren (Cys, C) und kann daher durch Einführung eines Cysteinrestes an einer gewünschten Position kovalent mit einem Farbstoff markiert werden. Die Aminosäure Serin 20 befindet sich lösungsmittel exponiert in Schleife II der globulären *beta-grasp* Faltung von Ubiquitin und scheint nicht essentiell für dessen Funktion zu sein [121]. Die Ubiquitinvariante Ub S20C lässt sich in ausreichender Menge herstellen, reinigen und kovalent mit Alexa-Fluor Farbstoffen verknüpfen, die photostabil, hell und gut zu

konjugieren sind. Die Markierungseffizienz von Ub S20C mit Alexa-Fluorophoren (C5-Maleimide) betrug in allen Ansätzen > 90 %. Die Position der Markierung liegt nach struktureller Einschätzung in genügend großem Abstand zu den Verknüpfungspunkten der am häufigsten gebildeten Polyubiquitinketten, nämlich K11, K48, K63 und dem C-Terminus (Abbildung 2-2 B). *In vitro* Ubiquitinierungsreaktionen werden durch die Fluoreszenzmarkierung nicht beeinflusst [99].

Untersuchungen, die auf Förster-Resonanzenergietransfer, kurz FRET, beruhen, benötigen zwei Fluorophore, die ein geeignetes Donor-Akzeptor-Paar bilden. Eine Energieübertragung von dem angeregten Donor- auf den Akzeptorfarbstoff erfolgt bei einer Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors. In Abbildung 2-2 sind die Anregungs- und Fluoreszenzspektren der Fluorophore Alexa-Fluor 488 (A488) und Alexa-Fluor 594 (A594) nach Herstellerinformationen, sowie die Emissionen der markierten Ubiquitinvarianten (Ub488 und Ub594) dargestellt.





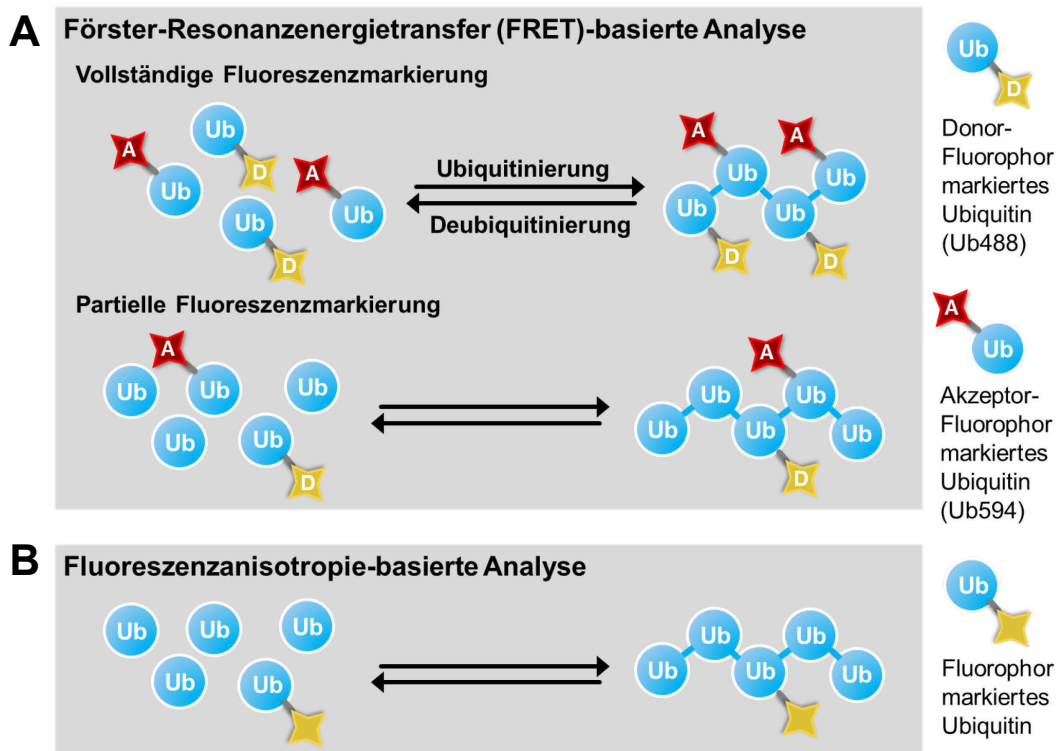
**Abbildung 2-2: Fluoreszenzmarkierung der Ubiquitinvariante S20C mit Alexa488- (Ub488) oder Alexa594-Fluorophor (Ub594).** In (A) sind die Anregungs- (--) und Emissionsspektren (—) der Fluorophore Alexa488 (—) und Alexa594 (—) nach Herstellerangaben dargestellt (Fluorescence SpectraViewer, life technologies). Die Spektren der Alexa488-Emission und Alexa594-Anregung überlappen und veranschaulichen ein Donor-Akzeptorpaar des Förster-Resonanzenergietransfers. (B) Für die Fluoreszenzmarkierung von Ubiquitin wurde Serin 20 zu einem Cystein ausgetauscht (Ub S20C). Das kovalent gebundene Fluorophor (■) befindet sich weit entfernt von den Verknüpfungsstellen der gängigsten Ubiquitinketten, die über K11, K48, K63 (■) und den C-Terminus (■) verbunden sind. In Abbildung 2-4 D ist die Position der Markierung in einem K48-verknüpften Tetraubiquitinmolekül dargestellt. (C) Die Emissionsspektren von Ub488 (—) und Ub594 (—) wurden nach Anregung bei 495 nm bzw. 590 nm gemessen.

### 2.1.3 Fluoreszenz-basierte Methoden zur Untersuchung von Polyubiquitinierungsreaktionen

Klassisch werden *in vitro* Ubiquitinierungen durch eine Entnahme von Proben nach unterschiedlichen Reaktionszeiten mit anschließender SDS-PAGE und *Western Blotting* mit anti-Ubiquitin Antikörper analysiert. Fluoreszenzmarkierte Ubiquitinmoleküle, die in Ubiquitinierungsreaktionen eingesetzt werden, ermöglichen es den Aufbau von Ubiquitinketten spektroskopisch zu verfolgen. Der Gebrauch von Ubiquitin und fluoreszenzmarkierter Varianten wird je nach der Art der Fluoreszenz-basierten Methode angepasst (Abbildung 2-3). FRET-basierte Experimente benötigen Donor- (Ub488) und Akzeptorfluorophor-markiertes Ubiquitin (Ub594). Während der Ubiquitinierungsreaktion werden beide Ubiquitinvarianten statistisch gleichmäßig verteilt in die Ubiquitinketten eingebaut und so in räumliche Nähe gebracht, wodurch FRET-Ereignisse ermöglicht werden. Bei einer Energieübertragung steigt die Akzeptorfluoreszenz und die Donoremission nimmt ab. FRET-basierte Messungen können mit einem unterschiedlichen Maß der Fluoreszenzmarkierung durchgeführt werden (2.1.3.1 und 2.1.3.2). Sind sämtliche Ubiquitinmoleküle einer Reaktion entweder Donor- oder Akzeptor-markiert, wird die Zusammensetzung als „vollständige Fluoreszenzmarkierung“ bezeichnet. Reaktionen mit „partieller Fluoreszenzmarkierung“ beinhalten zusätzlich nicht-markierte Ubiquitineinheiten.

In Fluoreszenzanisotropie-basierten Analysen der *in vitro* Ubiquitinierung werden polarisierte Emissionen der fluoreszenzmarkierten Ubiquitinvariante Ub488 gemessen, die in einem Gemisch mit nicht-markierten Einheiten vorliegen. Die Fluoreszenzanisotropie ist ein Maß für die freie Drehbarkeit des Fluorophors und wird in biochemischen Untersuchungen eingesetzt, um Informationen über die Größe und Form von Proteinen zu gewinnen. In Ubiquitinierungsreaktionen werden Ubiquitinmonomere, die eine hohe Drehbarkeit aufweisen, zu

eingeschränkt beweglichen Polymeren verknüpft. Das Anisotropiesignal steigt bei der Ketten-synthese, da die Beweglichkeit des Fluorophors abnimmt.

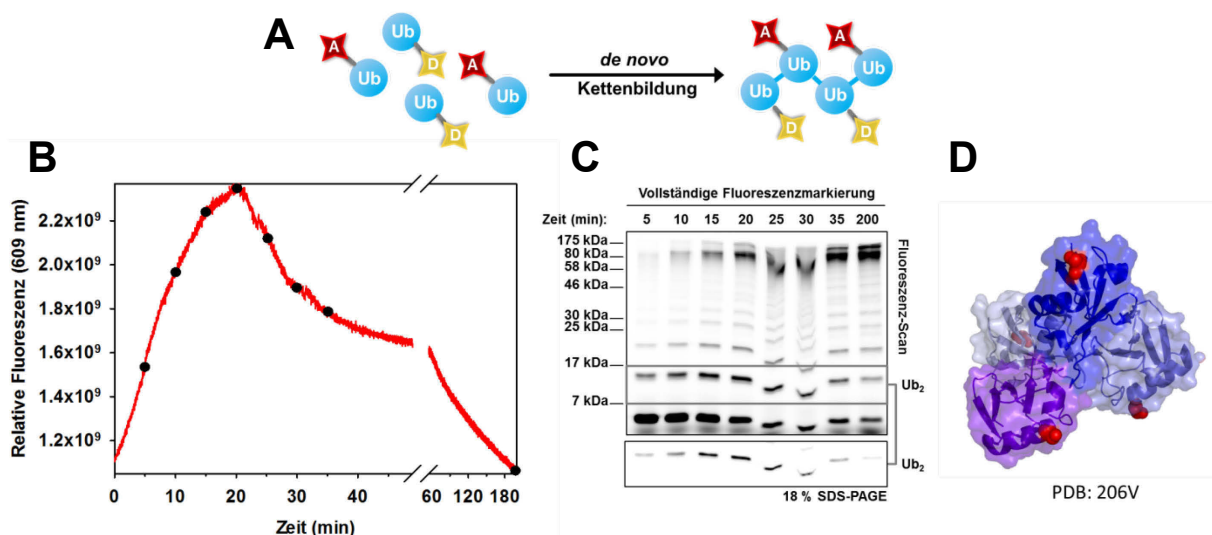


**Abbildung 2-3: Fluoreszenz-basierte Methoden, die zur Untersuchung von *in vitro* Polyubiquitinierungsreaktionen eingesetzt werden können.** (A) Untersuchungen mittels FRET werden bei vollständiger oder partieller Fluoreszenzmarkierung der eingesetzten Ubiquitineinheiten durchgeführt. Gleiche Teile der Moleküle sind entweder mit einem Donor- oder einem Akzeptorfluorophor versehen. Der Aufbau von Ubiquitinketten bringt die beiden Farbstoffe in räumliche Nähe und ermöglicht eine Energieübertragung. (B) Die Analysen der Kettensynthese mittels Fluoreszenzanisotropie beruhen auf einer einfachen Fluoreszenzmarkierung eines Bruchteils der Ubiquitinmoleküle. Während der Ubiquitinierungsreaktion werden Ubiquitinpolymere gebildet, deren Drehbarkeit sich mit zunehmender Größe verringert. Eine Abnahme der Beweglichkeit des Fluorophors wird in Fluoreszenzanisotropiemessungen verfolgt. In allen dargestellten Reaktionen werden Ubiquitinketten ausgehend von Monomeren *de novo* aufgebaut.

### 2.1.3.1 FRET-basierte Untersuchungen mit vollständiger Fluoreszenzmarkierung

Fluoreszenzmessungen von Ubiquitinierungsreaktionen mit vollständiger Markierung der eingesetzten Ubiquitinmoleküle ergeben nach Anregung des Donors einen unerwarteten Verlauf der Akzeptoremission. Bei einer kontinuierlichen Synthese von Polyubiquitin ist ein stetig ansteigendes Signal mit einer Sättigung in einem Plateau anzunehmen. Die gemessene Emission sinkt jedoch nach einem anfänglichem Anstieg (Abbildung 2-4 B). Fluoreszenzmessungen mit einer parallel durchgeführten Probenentnahme zeigen einen ähnlichen

zeitlichen Verlauf der Akzeptoremission und des Diubiquitinsignals im Fluoreszenz-Scan (Abbildung 2-4 B, C). Zu Beginn der Ubiquitinierung wird Diubiquitin als erstes Verknüpfungsprodukt vermehrt gebildet und akkumuliert. Im späteren Reaktionsverlauf wird das Dimer in hochmolekulare Ketten eingebaut und die Ub<sub>2</sub>-Konzentration sinkt. Bei einer vollständigen Fluoreszenzmarkierung scheint die Akzeptorfluoreszenz lediglich das Vorkommen von Diubiquitin aufzuzeichnen, während unbemerkt von der Messung Polyubiquitin erzeugt wird. Am plausibelsten ist diese Beobachtung durch das Phänomen der Eigenlöschung der Fluoreszenz zu erklären. Erhöhte lokale Konzentrationen von Fluorophoren können dazu führen, dass die Fluoreszenz eines Fluorophors durch ein anderes, das sich in räumlicher Nähe befindet, reduziert oder komplett verhindert wird [122]. Polymere von Ubiquitin (8,6 kDa) besitzen eine hohe lokale Fluorophordichte bei vollständiger Fluoreszenzmarkierung, besonders in der kompakten Konformation von K48-verknüpften Ketten (Abbildung 2-4 D).

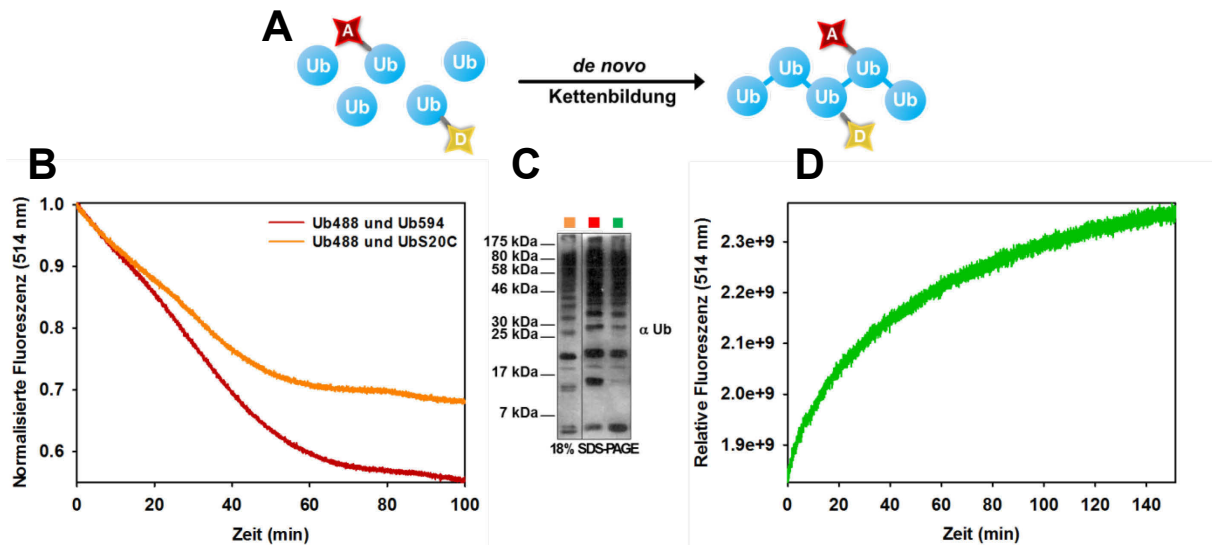


**Abbildung 2-4: FRET-Messungen von *in vitro* Polyubiquitinierungsreaktionen mit einer vollständigen Fluoreszenzmarkierung der eingesetzten Ubiquitinmoleküle verfolgen das Vorkommen von Diubiquitin.** (A) Polyubiquitinketten werden durch cCue1/Ubc7/cHrd1 bei 30 °C aus fluoreszenzmarkierten Ubiquitineinheiten aufgebaut, die äquimolar entweder mit einem Donor-(A488) oder Akzeptorfluorophor (A594) versehen sind. (B) Die relative Fluoreszenz bei 609 nm nach Anregung bei 495 nm ist gegen die Zeit aufgetragen. Während der Messung wurden Proben zu den gekennzeichneten Zeitpunkten (●) entnommen und durch SDS-PAGE und Fluoreszenz-Scanning analysiert (C). Der Verlauf der Akzeptoremission korreliert mit den Intensitäten des Diubiquitinsignals in dem Fluoreszenz-Scan. Bei einer hohen Fluorophordichte kann eine Eigenlöschung der Fluoreszenz auftreten. Besonders bei K48-verknüpften Ubiquitinketten, die eine kompakte Konformation aufweisen, liegen die Fluorophore in hohen lokalen Konzentrationen vor. (D) Die Positionen der Fluoreszenzmarkierung sind in der Struktur von K48-Tetraubiquitin (PDB: 206V) rot hervorgehoben.

### 2.1.3.2 FRET-basierte Untersuchungen mit partieller Fluoreszenzmarkierung

Mit dem Wissen, dass bei einer vollständigen Markierung der Ubiquitineinheiten die Fluoreszenz innerhalb der Ketten getilgt wird, wurde die Konzentration der fluoreszenzmarkierten Monomere reduziert. Durch Zugabe von *wildtyp* Ubiquitin liegen in Ansätzen mit „partieller Fluoreszenzmarkierung“ nur 20 % der Ubiquitinmoleküle fluoreszenzmarkiert vor, die zu gleichen Teilen entweder mit einem Donor- oder Akzeptorfarbstoff verknüpft sind. Fluoreszenzmessungen ergeben nach der Anregung des Donors wie erwartet eine Abnahme der Donor- und eine Zunahme der Akzeptoremission (Abbildung 2-6 links D, F). Der Verlauf der Signale ist stetig und spiegelt eine kontinuierliche Synthese von Polyubiquitin wider. Durch Zugabe eines deubiquitinierenden Enzyms kehrt sich der Signalverlauf um und die Donorfluoreszenz steigt (Abbildung 2-5 D). Der gezeigte Abbau der Ubiquitinketten ist unvollständig, weshalb die Donoremission nicht komplett wiederhergestellt wird (Abbildung 2-5 C, D).

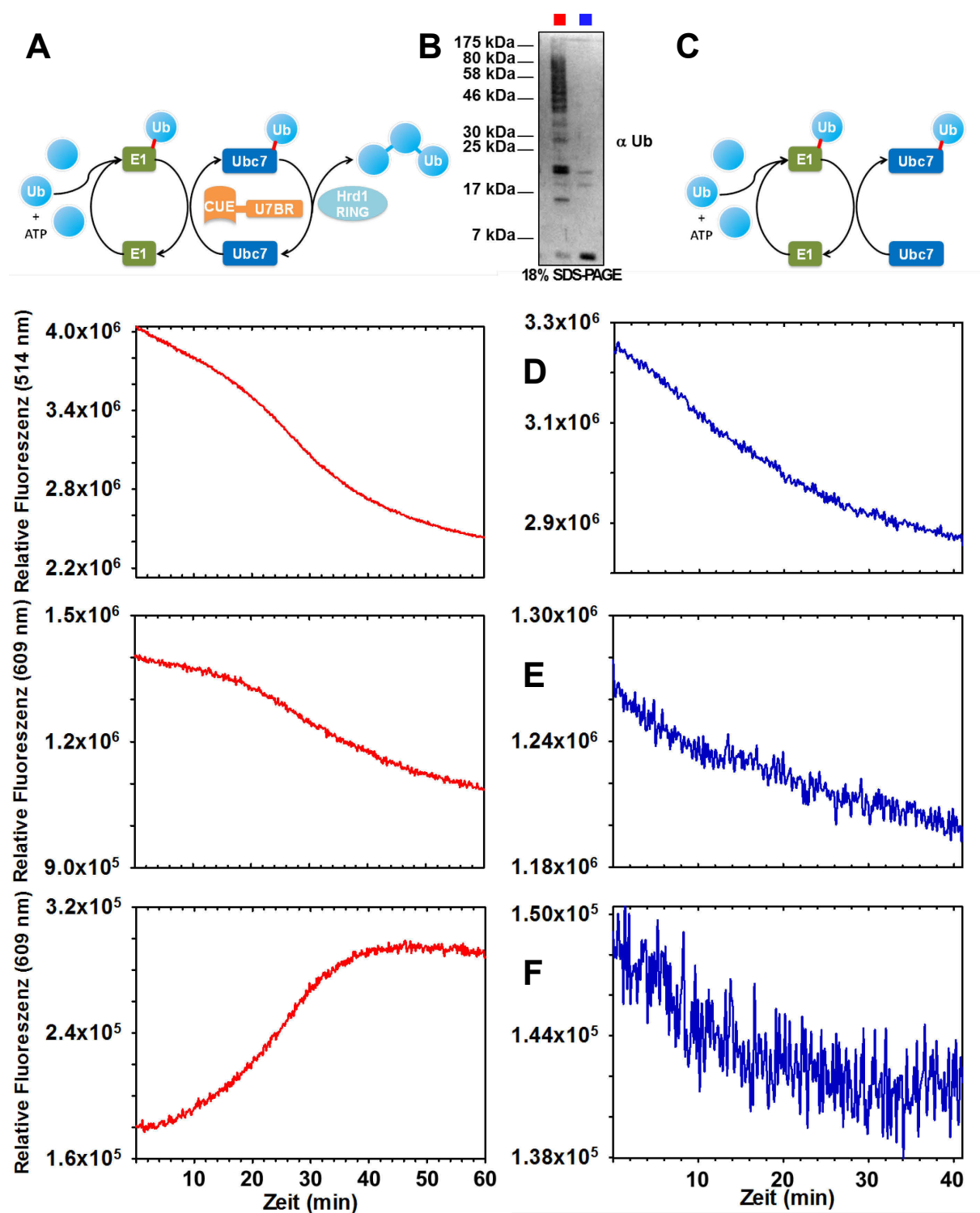
Die Abnahme der Akzeptorfluoreszenz (Ub594) nach dessen Anregung in Abbildung 2-6-E-links ist ungewöhnlich. Es scheint, dass die Fluoreszenz durch Ereignisse zusätzlich zu der Energieübertragung verringert wird. Messungen mit nur donormarkierten Ubiquitin (Ub488) zeigen ebenfalls einen Abfall der Emission, der geringer ausfällt als in Experimenten mit Ub594/FRET (Abbildung 2-5 B). Vermutlich führen Fluoreszenzlöschungen, innerhalb der Ubiquitinierungskaskade oder der Ketten, zu den sinkenden Signalen. Reaktionen ohne cCue1 und cHrd1 simulieren die Beladung von Ubc7 mit Ubiquitinmolekülen und zeigen einen leichten Abfall der Emissionen in allen Kanälen (Abbildung 2-6 rechts D, E, F). Vermutlich führt unter anderem eine Veränderung der Umgebung des Fluorophors bei der Beladung des E1- oder E2-Enzyms zu einer geringeren Fluoreszenz. Experimente mit einer inaktiven Variante von Ubc7 (C89S) deuten darauf hin, dass die Verknüpfung des markierten Ubiquitinmoleküls mit dem E2-Enzym, und nicht mit dem E1, ein schwächeres Signal verursacht (Abbildung 2-7).



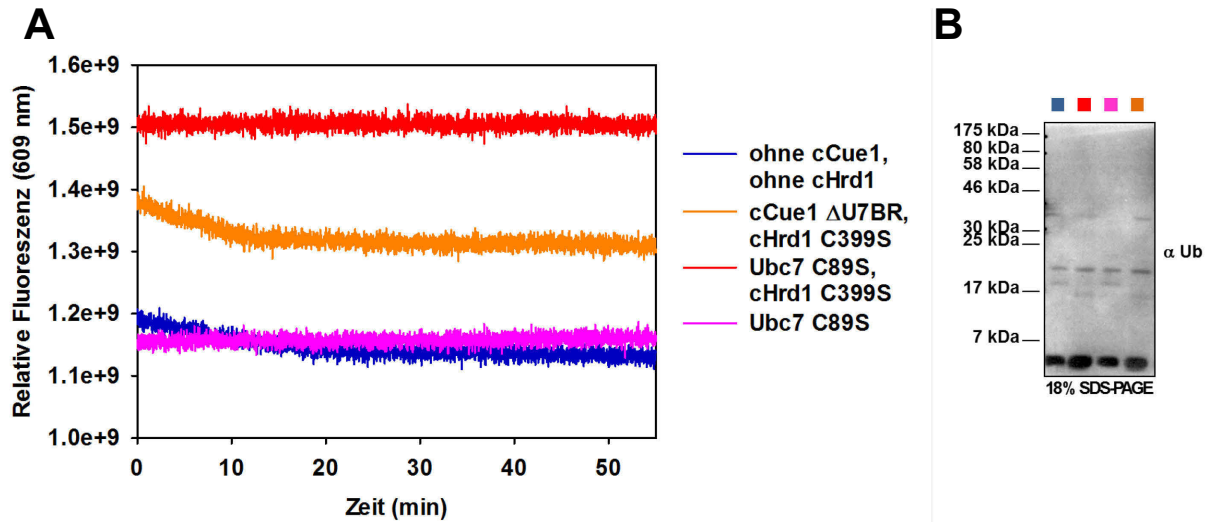
**Abbildung 2-5: FRET-Messungen von *in vitro* Polyubiquitinierungsreaktionen mit einer partiellen Fluoreszenzmarkierung verfolgen den Verlauf der *de novo* Kettenbildung.** (A) Polyubiquitinketten werden aus Ubiquitinmonomeren aufgebaut, die entweder nicht-markiert (80 %) oder Donor- oder Akzeptorfluorophormarkiert (20 %) sind. Nach der Anregung bei 495 nm sinkt die Donoremission bei 514 nm während der Synthese von Ubiquitinketten (B) und steigt wieder nach der Zugabe einer Deubiquitinase (D). Der Kettenaufbau durch cCue1/Ubc7/cHrd1 und die unvollständige Deubiquitinierung durch Usp8 wurden bei 20 °C durchgeführt und durch SDS-PAGE und *Western Blotting* mit anti-Ubiquitin Antikörper überprüft (C). Eine Ubiquitinierungsreaktion mit Ub488 und der nicht-markierten Ubiquitinvariante S20C führt ebenfalls zu einer Abnahme der Akzeptoremission. Der Signalunterschied von Reaktionen mit (B, —) und ohne Akzeptorfluorophor/Ub594 (B, —) ist anscheinend auf eine Energieübertragung von Ub488 auf Ub594 zurückzuführen.

Die Abbildung befindet sich auf der folgenden Seite.

**Abbildung 2-6: Fluoreszenzmessungen von Ubiquitinierungsreaktionen und der Beladung von Ubc7 im Vergleich.** Einer *de novo* Kettensynthese durch cCue1/Ubc7/cHrd1 (A und — in D, E, F) ist die Beladung von Ubc7 mit Ubiquitinmolekülen (C und — in D, E, F) gegenübergestellt. Beide Reaktionen wurden bei 30 °C mit partieller Fluoreszenzmarkierung durchgeführt und durch SDS-PAGE und *Western Blotting* mit anti-Ubiquitin Antikörper überprüft (B). Die Emissionen bei 514 nm nach Anregung bei 495 nm (D) und die Emissionen bei 609 nm nach Anregung bei 590 nm (E) und bei 495 nm (F) sind als Funktion der Zeit gezeigt. Anscheinend führen FRET-Ereignisse zu einer sinkenden Donor- und steigenden Akzeptoremission. Darüber hinaus nimmt das Signal des Akzeptors nach dessen Anregung ab (E). Sinkende Emissionen, die nicht auf einer Energieübertragung beruhen, sind vermutlich unter anderem auf die Beladung von Ubc7 mit Ubiquitin zurückzuführen. Fluoreszenzmessungen dieser Reaktionen zeigen sinkende Signale (— in D, E, F).



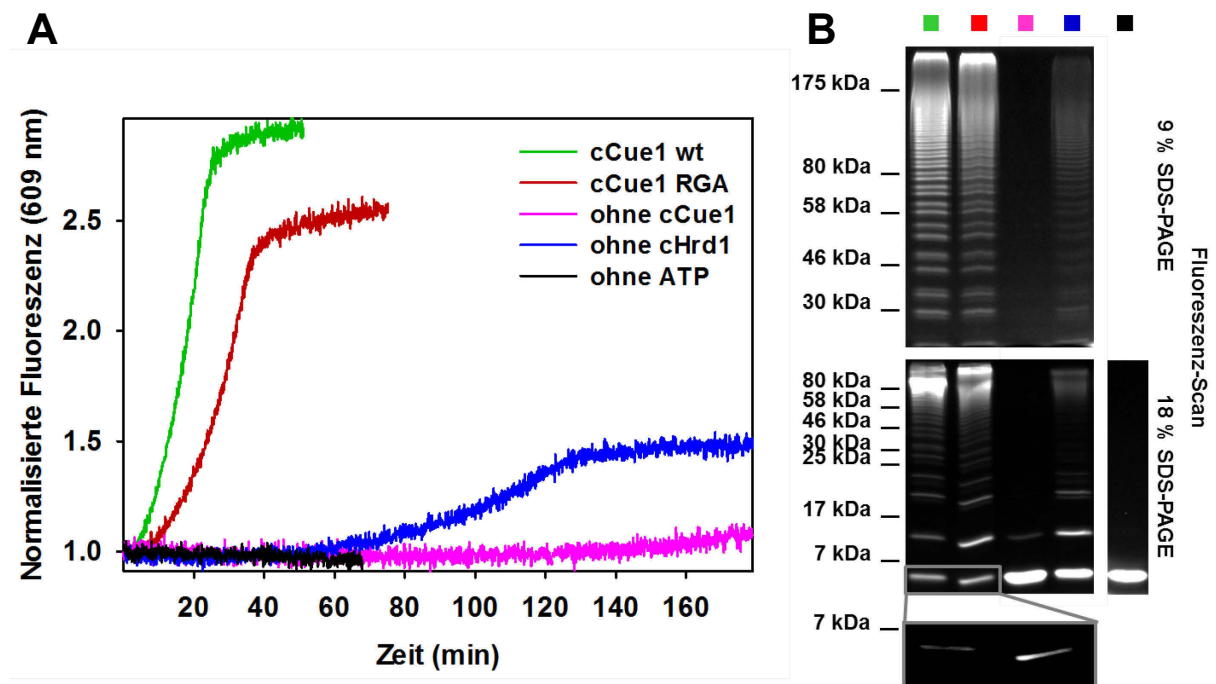
Die Abbildungsunterschrift befindet sich auf der vorherigen Seite.



**Abbildung 2-7: Die Beladung von Ubc7 und nicht des E1-Enzyms führt zu einer Abnahme der Fluoreszenz.** (A) Die Akzeptoremission bei 609 nm ist nach Anregung bei 495 nm gegen die Zeit aufgetragen. Es wurden unterschiedliche zusammengesetzte *in vitro* Beladungsexperimente bei 30 °C durchgeführt. Die Reaktionen, die eine inaktive Ubc7-Variante (C89S) beinhalten, ergeben gleichbleibende Signale (—, —). Hingegen führt die Anwesenheit von aktiven Ubc7 zu einer Abnahme der Emission (—, —). (B) Die Reaktionen wurden durch SDS-PAGE und *Western Blotting* mit anti-Ubiquitin Antikörper überprüft.

Trotz der unterschiedlichen Ursachen für die Signalveränderung, kann die *de novo* Synthese von Ubiquitinketten in FRET-basierten Experimenten verfolgt werden. In Reaktionen ohne ATP oder cCue1 werden keine Ubiquitinmoleküle verknüpft (Abbildung 2-8 B) und die Akzeptoremission bleibt nach Anregung des Donorfluorophors unverändert (Abbildung 2-8 A). In Abwesenheit der Hrd1-RING-Domäne ist die Polyubiquitinierung schwach und wird mit einem verzögerten und geringen Signalanstieg detektiert. Die schnellste Synthese von hochmolekularen Ketten wird durch E1, cCue1, Ubc7 und cHrd1 katalysiert. Im Vergleich sind Reaktionen mit cCue1 RGA langsamer und führen zu weniger Ubiquitinkonjugaten.



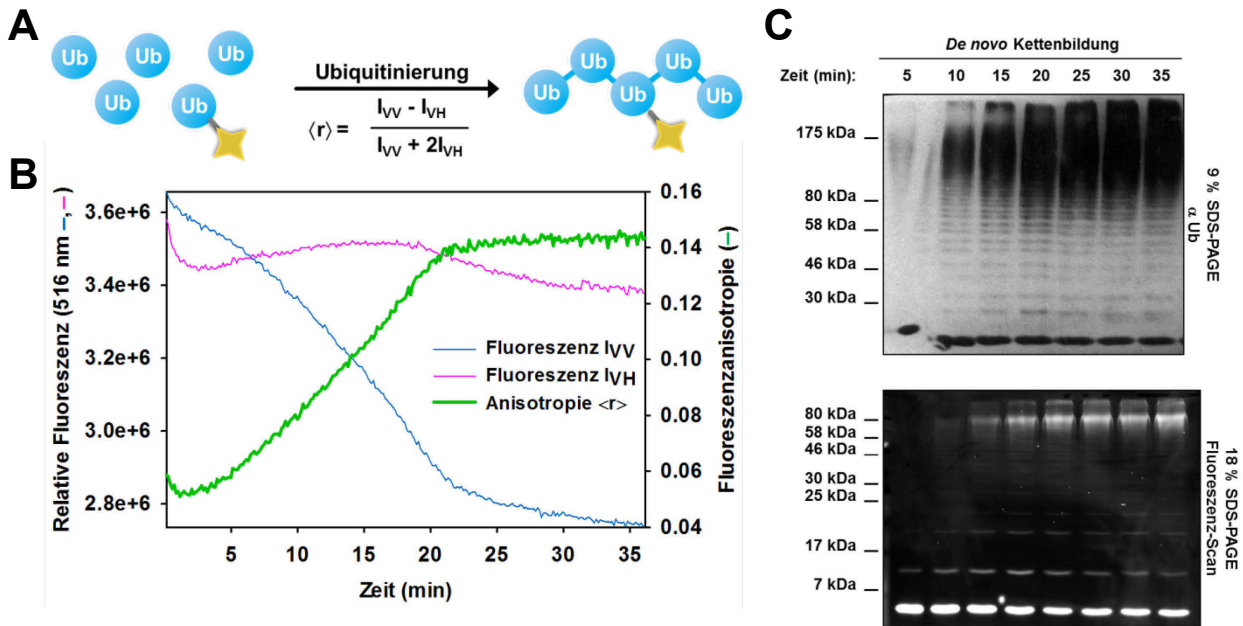


**Abbildung 2-8: FRET-basierte Untersuchungen von *in vitro* Ubiquitinierungsreaktionen zeigen einen stimulierenden Einfluss von cCue1 und cHrd1 auf die *de novo* Kettenbildung.** (A) Die Akzeptoremission bei 609 nm ist nach Anregung des Donors bei 495 nm als Funktion der Zeit dargestellt. Untersucht wurden *in vitro* Polyubiquitinierungsreaktionen mit cCue1 wt (—), mit Cue1 RGA (—), ohne cCue1 (—), ohne cHrd1 (—) oder ohne ATP (—). Die Experimente mit einer partiellen Fluoreszenzmarkierung der eingesetzten Ubiquitinmoleküle wurden bei 30 °C durchgeführt. (B) Die Produkte der *in vitro* Reaktionen wurden durch SDS-PAGE (18 % und 9 %) und Fluoreszenz-Scanning analysiert.

### 2.1.3.3 Fluoreszenzanisotropiemessungen

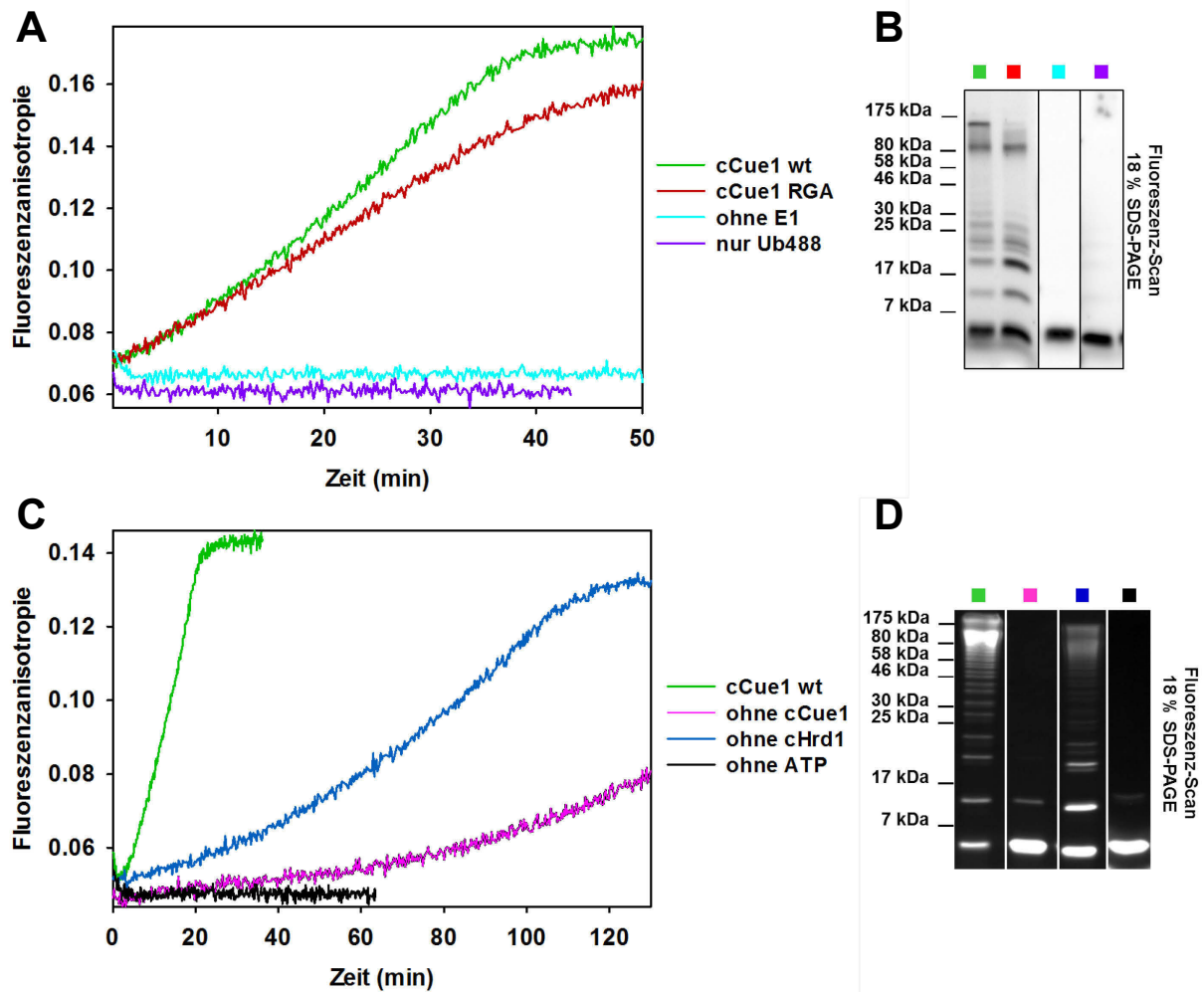
In Fluoreszenzanisotropiemessungen werden Fluorophore selektiv mit polarisiertem Licht angeregt und die polarisierten Emissionen rechtwinklig zur Anregungsachse gemessen. Der daraus errechnete Anisotropiewert gibt den Grad der Polarisierung des emittierten Lichts an (Abbildung 2-9 B). Das Maß der Polarisierung korreliert mit der Beweglichkeit des Fluorophors. Der hauptsächliche Grund, dass Moleküle ihre Orientierung ändern, ist die Rotationsdiffusion. Das Ausmaß der Rotationsdiffusion auf ein Molekül ist abhängig von dessen Größe und Form. Demzufolge können Veränderungen des Molekulargewichts eines Moleküls mittels Fluoreszenzanisotropie verfolgt werden. Ubiquitinkonjugate verlieren ihre freie Drehbarkeit mit zunehmender Polymerisierung. Im Vergleich zu einem Monomer verursachen fluoreszenzmarkierte Ubiquitinketten eine geringere Depolarisierung der Emission des Fluorophors. Folglich steigt bei einer Kettensynthese die Polarisierung der Fluoreszenz und damit der Anisotropiewert (Abbildung 2-9 B).





**Abbildung 2-9: Fluoreszenzanisotropiemessungen verfolgen den Aufbau von Ubiquitinketten.** (A) Für die Fluoreszenzanisotropie-basierte Analyse der *de novo* Kettenbildung ist ein Teil der verwendeten Ubiquitinmoleküle fluoreszenzmarkiert (Ub488) und wird statistisch verteilt in Ubiquitinketten eingebaut. Die freie Drehbarkeit des Fluorophors nimmt mit einer steigenden Länge der Ketten ab. (B) In Fluoreszenzanisotropiemessungen werden die polarisierten Emissionen bei 516 nm (—, —) nach Anregung bei 495 nm gemessen und umgerechnet als Anisotropiewerte angegeben (—). Das Signal steigt während der Polyubiquitinierung durch cCue1/Ubc7/cHrd1 bei 30 °C und erreicht einen konstanten Endwert. (C) Kontinuierlich entnommene Proben veranschaulichen nach einer SDS-PAGE mit anschließendem Fluoreszenz-Scanning und *Western Blotting* mit anti-Ubiquitin Antikörper die sukzessive Synthese von Polyubiquitin.

Die *de novo* Synthese von Ubiquitinketten kann neben FRET-basierten Messungen auch mittels Fluoreszenzanisotropie untersucht werden. Ubiquitinierungsreaktion erzielen mit einer Fluoreszenzmarkierung der eingesetzten Ubiquitinmoleküle von 10 % klare und reproduzierbare Signalveränderungen. Ohne ATP in den Ansätzen sind die Anisotropiewerte gleichbleibend niedrig (Abbildung 2-10 C). In Abwesenheit des zytosolischen Fragments von cHrd1 oder cCue1 wird Polyubiquitin langsamer aufgebaut. Reaktionen in Abbildung 2-10 A wurden mit höheren Ubiquitinkonzentrationen als in Abbildung 2-10 C durchgeführt. Die Kinetiken zeigen ähnlich zu der FRET-basierten Untersuchung eine verzögerte Polyubiquitinierung bei einer funktionslosen CUE-Domäne. Kontrollexperimente ohne das E1-Enzym oder nur mit Ub488 liefern unveränderte Signale.

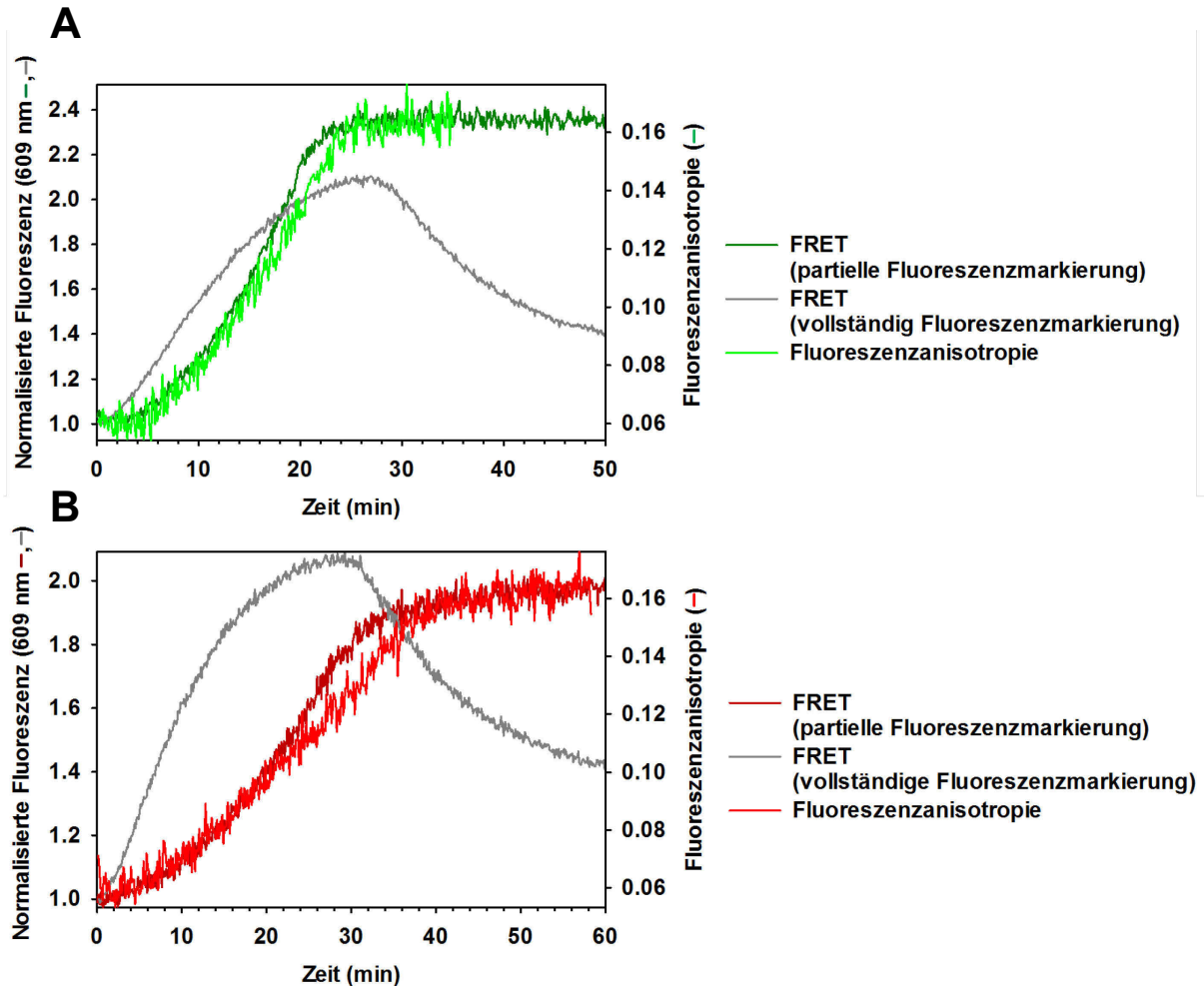


**Abbildung 2-10: Fluoreszenz-anisotropiemessungen von *in vitro* Ubiquitinierungsreaktionen veranschaulichen den stimulierenden Effekt von cCue1 und cHrd1 auf die *de novo* Kettenbildung.** Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz-anisotropie von Reaktionen mit unterschiedlicher Zusammensetzung: (A) 0,1  $\mu$ M E1 und 10  $\mu$ M Ubiquitin (0,2  $\mu$ M Ub488 und 9,8  $\mu$ M Ub) in 50 mM Tris/HCl, pH 8 (C) 0,05  $\mu$ M E1 und 2,7  $\mu$ M Ubiquitin (0,3  $\mu$ M Ub488 und 2,7  $\mu$ M Ub) in 20 mM HEPES/NaOH, pH 7,5. Folgende Reaktionsansätze wurden bei 30 °C untersucht: cCue1 wt (—), cCue1 RGA (—), ohne E1 (—), nur Ub488 (—), ohne cCue1 (—), cHrd1 (—), ohne ATP (—). (B, D) Die Reaktionsprodukte wurden durch SDS-PAGE und Fluoreszenz-Scanning überprüft. Die gezeigten Fluoreszenz-Scans wurden mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Scannern aufgenommen (dunkler Hintergrund mit FLA 3000; heller Hintergrund mit FLA 9500).

#### 2.1.3.4 Korrelation der FRET- und Fluoreszenz-anisotropiemessungen

In Abbildung 2-11 werden die Kinetiken der *de novo* Kettensynthese verglichen, die mittels Fluoreszenz-anisotropie oder Akzeptorfluoreszenz bei vollständiger und partieller Fluoreszenzmarkierung gemessen wurden. Die Emission bei vollständiger Markierung steigt im zeitlichen Verlauf der Polyubiquitinierung als erstes Signal und verfolgt das Vorkommen von

Diubiquitin. Mit etwas Verzögerung beschreiben die Akzeptoremission bei partieller Markierung und die Fluoreszenzanisotropie die Synthese von hochmolekularen Ubiquitinketten. Die Messwerte beider Methoden korrelieren bis auf ein leichtes Abflachen der Fluoreszenzanisotropie nach einer Reaktionsdauer von 15 min.

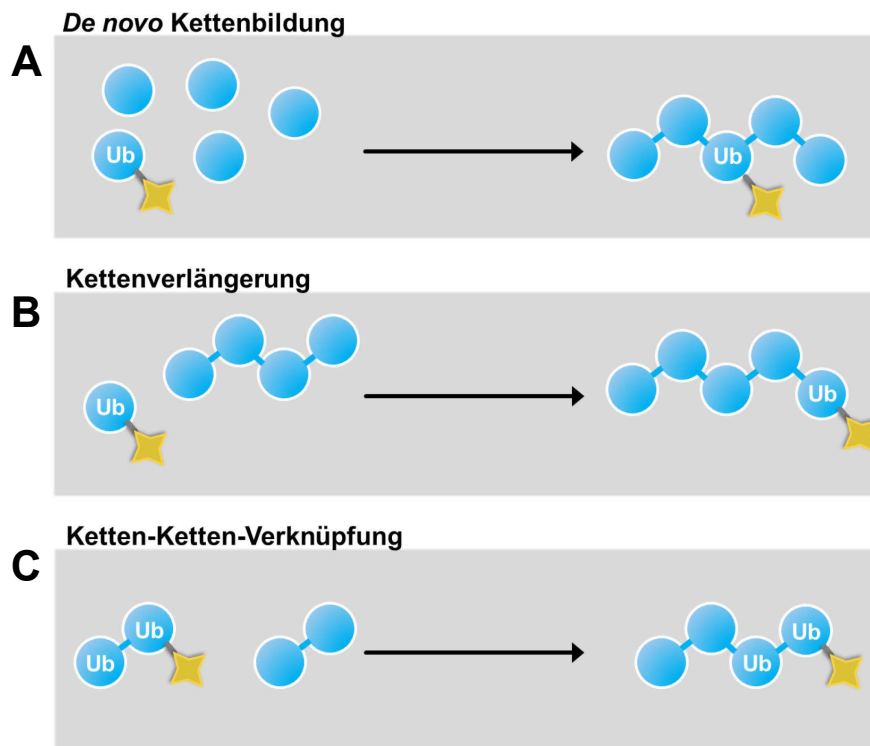


**Abbildung 2-11: Korrelation der Signale von FRET- und Fluoreszenzanisotropie-basierten Analysen der *de novo* Kettenbildung mit (A, cCue1 wt) und ohne (B, cCue1 RGA) funktioneller CUE-Domäne.** Die normalisierten Akzeptoremissionen bei 609 nm und die Fluoreszenzanisotropie (jeweils angeregt bei 495 nm) sind gegen die Zeit aufgetragen. Die Fluoreszenzemission bei vollständiger Fluoreszenzmarkierung verfolgt das Vorkommen von Diubiquitin und steigt im Verlauf der Reaktion als erstes Signal (—). FRET-Messungen mit partieller Fluoreszenzmarkierung (—, —) und Fluoreszenzanisotropiemessungen (—, —) verfolgen die Ketten-synthese und korrelieren. Lediglich im späten Bereich der Reaktion, der Synthese von hochmolekularen Ketten, sind geringfügige Abweichungen zu beobachten.

#### 2.1.4 Angepasste Reaktionen der *in vitro* Ubiquitinierung

Die sigmoiden Verläufe der Kinetiken der *de novo* Kettensynthese weisen auf eine Vielzahl von unterschiedlichen Reaktionen hin. Das komplexe Gemisch von parallel ablaufenden

Verknüpfungen von Ubiquitinmolekülen ist schwierig zu analysieren und sollte auf die einzelnen Schritte des Kettenaufbaus beschränkt werden (Abbildung 2-12). Diubiquitin entsteht als kürzeste Kette durch die Konjugation von zwei Monomeren. Eine sukzessive Verknüpfung weiterer Ubiquitinmoleküle führt zu hochmolekularen Ubiquitinketten. Das Produkt einer Kettenerweiterung ist zugleich das Edukt der nächsten Verlängerungsreaktion. Die Verbindung von Ketten miteinander wäre ebenfalls denkbar. Angepasste *in vitro* Ubiquitinierungsreaktionen ermöglichen eine Analyse der Kinetiken einzelner Verknüpfungsreaktionen von Ubiquitin. In Verlängerungsexperimenten von Ketten kann der Aufbau von Polyubiquitin schrittweise untersucht werden. Die Ansätze beinhalten vorgefertigte Ubiquitinketten, die mit einer weiteren Ubiquitineinheit verlängert werden. Wiederum werden fluoreszenzmarkierte Ubiquitinmoleküle verwendet, um die Reaktionen zu verfolgen.



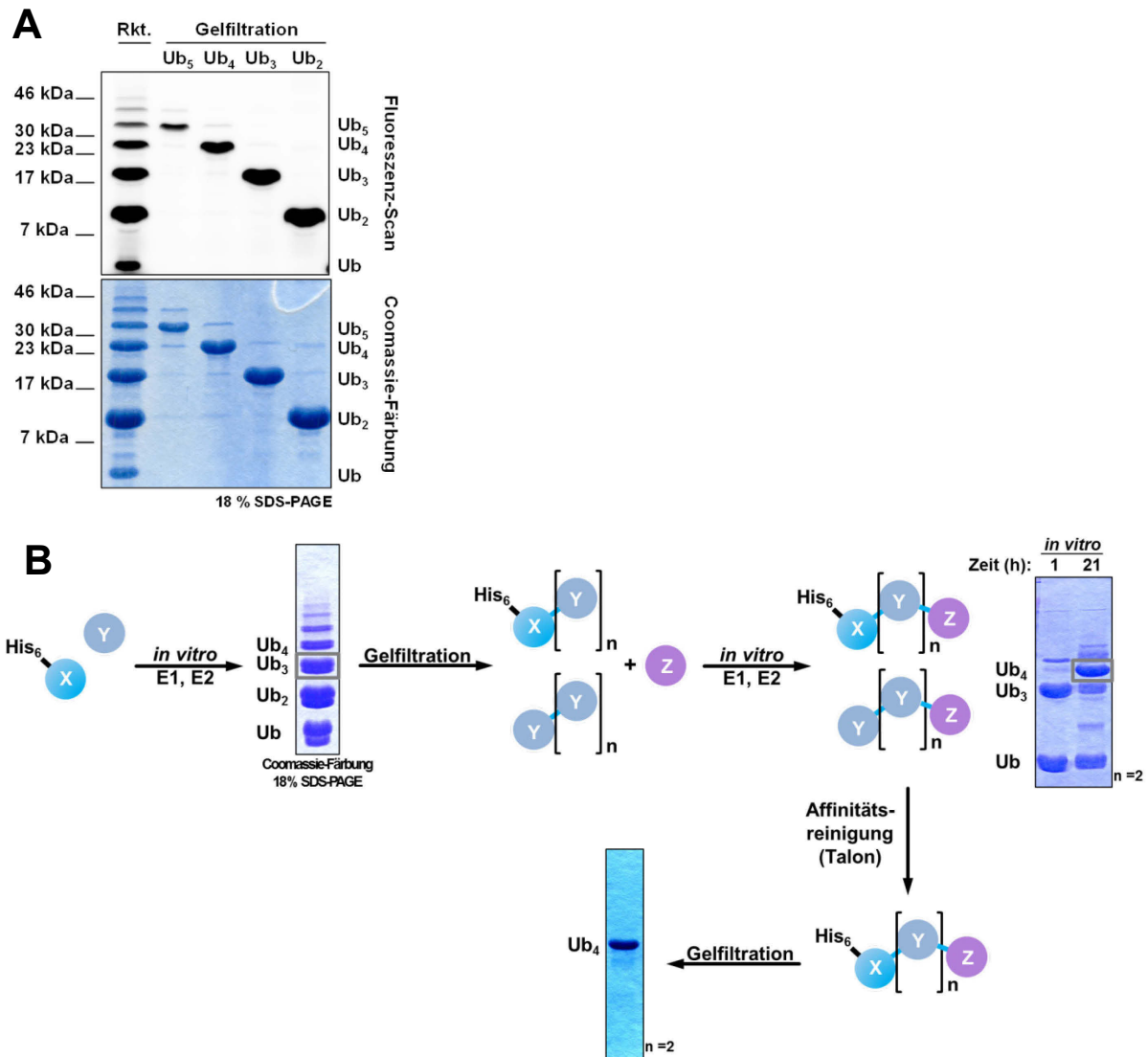
**Abbildung 2-12: Angepasste *in vitro* Reaktionen ermöglichen die Fluoreszenz-basierte Untersuchung unterschiedlicher Verknüpfungsreaktionen von Ubiquitinmolekülen.** (A) In einer *de novo* Synthese werden Ubiquitinketten aus einzelnen Monomeren aufgebaut, wobei viele unterschiedliche Verknüpfungsreaktionen von Ubiquitinmolekülen auftreten. (B) In Verlängerungsreaktionen von Ubiquitinketten werden vorgefertigte Oligomere verwendet. Die nicht-markierten Ketten werden im Vergleich zu den fluoreszenzmarkierten Ubiquitinmolekülen im Überschuss eingesetzt, um eine Verlängerung um eine Ubiquitineinheit zu erreichen. (C) Verknüpfungen von Ketten miteinander können durch eine Mischung aus markierten und nicht-markierten Ketten analysiert werden. In allen Ansätzen ist ein Teil der eingesetzten Ubiquitinmoleküle fluoreszenzmarkiert. Die Verknüpfungsreaktionen werden entweder durch eine kontinuierliche Probenentnahme, gefolgt von SDS-PAGE und Fluoreszenz Scanning oder mittels Fluoreszenzanisotropiemessungen verfolgt.

### 2.1.5 Die präparative Synthese von Ubiquitinketten

In Verlängerungsreaktionen werden die einzelnen Schritte der Synthese von Ubiquitinketten untersucht, indem vorgefertigte Ketten mit einzelnen fluoreszenzmarkierten Ubiquitinmolekülen verknüpft werden. Um den Einfluss der Kettenlänge oder der Art der Verknüpfung auf die Verlängerungsreaktion zu erfahren, wurden Di-, Tri- und Tetraubiquitinmoleküle, die über K48 oder K63 verknüpft sind, in präparativen Mengen hergestellt. Definierte Ubiquitinketten können zusätzlich für Untersuchungen des Kettenabbaus oder für Bindungsstudien der CUE-Domäne verwendet werden. Die Polymere wurden enzymatisch durch das E2-Enzym Cdc34 für K48- oder durch Ubc13/Uev1a für K63-Verknüpfungen assembliert und mittels Gelfiltration der Größe nach getrennt (4.2.3.11). In Abbildung 2-13 A ist exemplarisch die Produktion und Reinigung von K48-verknüpften Ketten mit 1% fluoreszenzmarkierten Ubiquitinmolekülen gezeigt.

Neben der Herstellung von homogen zusammengesetzten Polymeren können Ubiquitinvarianten auch selektiv an bestimmte Positionen innerhalb der Kette eingebaut werden. Hierdurch können beispielsweise Verknüpfungsreste für eine Verlängerung selektiv blockiert oder eine schwächere Bindung von UBDs an bestimmte Einheiten des Polymers erzielt werden. Ubiquitinketten, die eine definierte Reihenfolge der Monomere aufweisen, wurden durch eine stufenweise Synthese mit nachfolgenden Reinigungsschritten und der Verwendung von Ubiquitinvarianten produziert. Ein Ubiquitinmolekül, dessen C-Terminus durch eine Hexahistidin-Markierung (His<sub>6</sub>) blockiert ist, kann durch das E1-Enzym nicht aktiviert werden und fungiert lediglich als Ubiquitinakzeptor. Ketten, die diese Variante beinhalten, können außerdem über eine Talon-Affinitätschromatographie isoliert werden. Ubiquitinvarianten mit K zu R Substitutionen verhindern eine Verlängerung an den ausgetauschten Lysinresten.

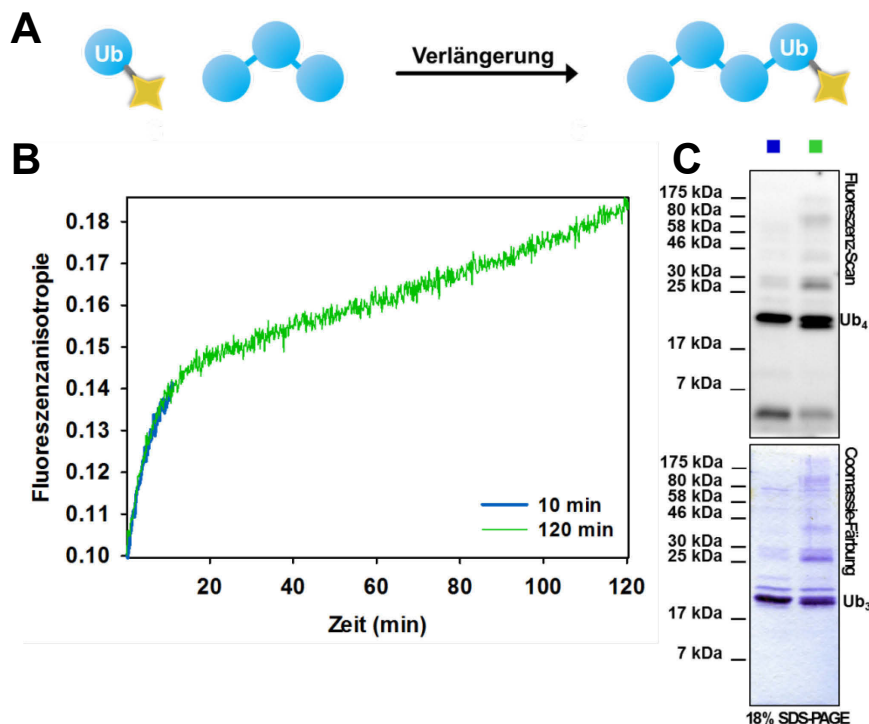
Die Synthesewege sind entsprechend der gewünschten Ubiquitinkette variabel. Der grundlegende Ablauf des präparativen Kettenaufbaus ist in Abbildung 2-13 B schematisch veranschaulicht.



**Abbildung 2-13: Die Präparative Synthese und Reinigung von K48- und K63-verknüpften Ubiquitinketten.** (A) Exemplarisch sind K48-verknüpfte Ubiquitinketten mit 1 % fluoreszenzmarkierten Ubiquitinmolekülen (Ub488) gezeigt. Die Oligomere wurden durch Cdc34 bei 37 °C aufgebaut (Rkt. Spur) und das Kettengemisch mittels Gelfiltration entsprechend der Größe getrennt (Ub<sub>5</sub>-Ub<sub>2</sub>). Die Qualität der Synthese und der Reinigung wurde durch SDS-PAGE, Fluoreszenz-Scanning und Coomassie-Färbung überprüft. (B) Eine stufenweise Synthese ermöglicht eine gezielte Inkorporation von Ubiquitinvarianten in die Kette. Das proximale Ende einer Kette wird durch eine Ubiquitinvariante X mit einer C-terminalen Hexahistidin-Markierung (His<sub>6</sub>) definiert. Mit der Variante Y werden Ubiquitinoligomere aufgebaut und eine Kettespezies mit gewünschter Anzahl an Monomeren isoliert. Eine dritte Ubiquitinvariante Z wird in einer zweiten Reaktion verknüpft und das Produkt über Talon-Affinitätschromatographie mit anschließender Gelfiltration gereinigt.

### 2.1.6 Kettenverlängerung und Ketten-Ketten-Verknüpfung

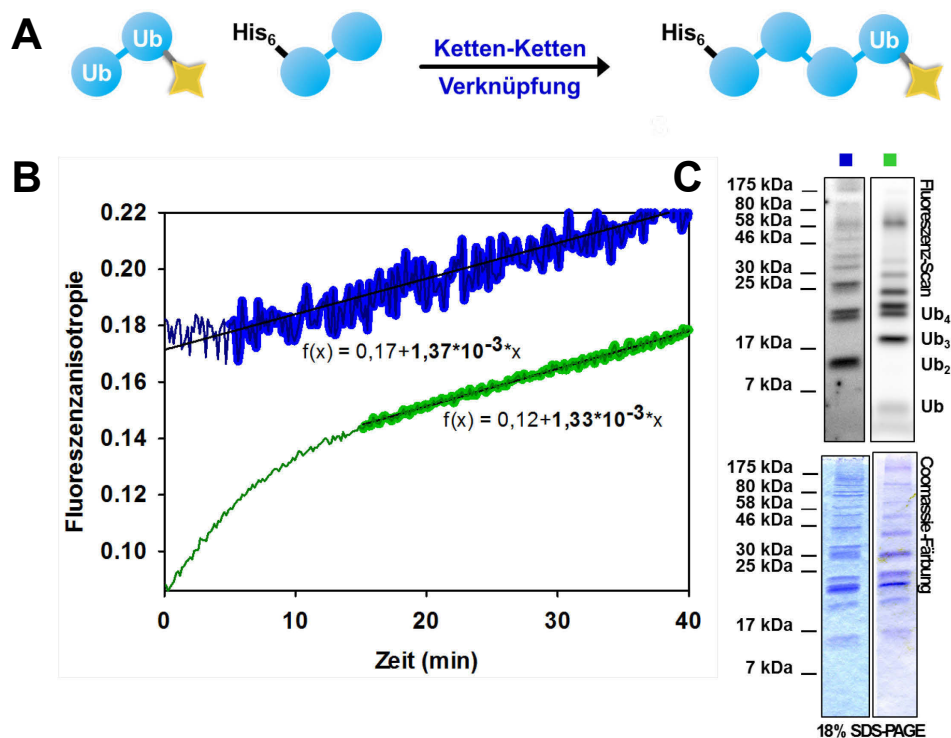
In Verlängerungsreaktionen werden vorgefertigte Ubiquitinketten im Überschuss vorgelegt, um eine Verlängerung um eine fluoreszenzmarkierte Ubiquitineinheit zu erreichen. Anstatt des sigmoiden Signalverlaufs einer *de novo* Kettenbildung, sollte eine homogene Verlängerungsreaktion eine einphasige Kinetik erzeugen. Messungen von Reaktionen mit vorgefertigten Triubiquitinmolekülen zeigen jedoch einen biphasischen Verlauf der Fluoreszenzanisotropie (Abbildung 2-14). Eine Probe, entnommen am Übergang von schneller zu langsamer Phase, zeigt Tetraubiquitin als Hauptprodukt. In der schnellen Reaktion scheint Triubiquitin um eine Einheit verlängert zu werden. Die zweite, langsame Reaktion führt zu hochmolekularen Ubiquitinkonjugaten, die vermutlich durch Verknüpfungen von zuvor gebildeten Ketten entstehen.



**Abbildung 2-14: Verlängerungsreaktionen von Ubiquitinketten sind biphasisch — eine schnelle Verlängerung um eine Ubiquitineinheit und eine langsame Ketten-Ketten-Verknüpfung.** (A) Experimentelle Konzeption: Vorgefertigte K48-verknüpfte Triubiquitinmoleküle werden im Überschuss eingesetzt und mit fluoreszenzmarkierten Ubiquitineinheiten durch cCue1/Ubc7/cHrd1 bei 20 °C verlängert. (B) Die Fluoreszenzanisotropie beschreibt eine zweiphasige Reaktionskinetik. In den ersten 10 min werden vorwiegend Ubiquitinmonomere an Triubiquitin gebunden (→). In der zweiten, langsameren Reaktion werden anscheinend Ubiquitinketten miteinander verknüpft (→). (C) Proben, die nach 10 min (■) und 120 min (■) entnommen und durch SDS-PAGE und Fluoreszenz-Scanning untersucht wurden, zeigen unterschiedliche Verknüpfungsprodukte. Das Hauptprodukt der ersten Reaktion ist Tetraubiquitin. Nach einer Reaktionsdauer von 120 min sind hochmolekulare Kettenkonjugate zu erkennen.



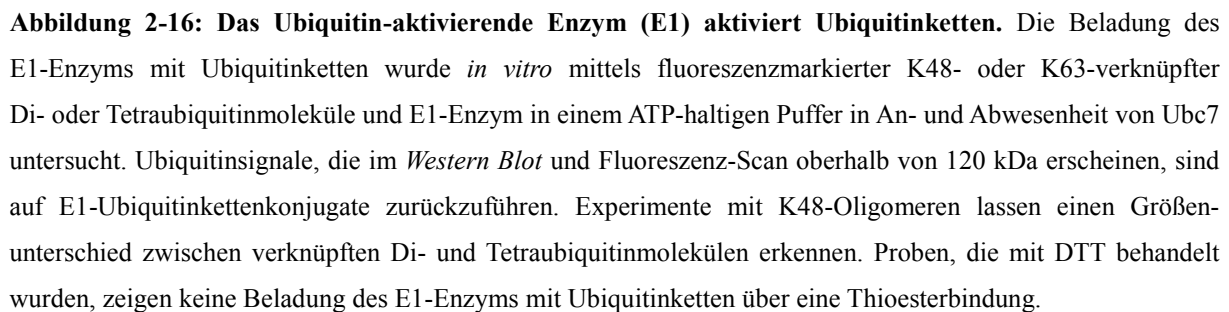
Verknüpfungsreaktionen von Ubiquitinketten können *in vitro* untersucht werden, indem zwei unterschiedlich aufgebaute Oligomere mit E1, E2 und/oder E3 inkubiert werden. Eine Kette, die im Überschuss eingesetzt wird, besitzt einen blockierten C-Terminus und dient als Akzeptor für eine zweite, fluoreszenzmarkierte Kette. Fluoreszenzanisotropiemessungen einer Verknüpfungsreaktion von Di- mit Diubiquitin und die langsame Phase der Verlängerung von Diubiquitin zeigen ähnliche Steigungen der Kinetiken (Abbildung 2-15 B). Ein weiterer Hinweis für eine Ketten-Ketten-Verknüpfung sind die vergleichbaren Muster der gebildeten hochmolekularen Polymere im Fluoreszenz-Scan (Abbildung 2-15 C).



**Abbildung 2-15: Die langsame Phase von Verlängerungsreaktionen ist vermutlich auf die Verknüpfung von Ubiquitinketten zurückzuführen.** (A) Experimentell ist die Untersuchung von Ketten-Ketten-Verknüpfungen durch cCue1/Ubc7/cHrd1 wie folgt konzipiert. Die Reaktion beinhaltet fluoreszenzmarkiertes Diubiquitin und Diubiquitin mit einer C-terminalen His<sub>6</sub>-Markierung. Das nicht-markierte Ub<sub>2</sub> wird im Überschuss eingesetzt und fungiert als Akzeptor für das fluoreszenzmarkierte Ub<sub>2</sub>. (B) Fluoreszenzanisotropiemessungen der Ketten-Ketten-Verknüpfungsreaktion (—) und der zweiten Phase einer Verlängerungsreaktion von Diubiquitin (—) sind vergleichend dargestellt. Die Steigungen sind im linearen Bereich der Kinetiken ähnlich. (C) Die Verknüpfungsprodukte beider Reaktionen, die bei 20 °C durchgeführt wurden, zeigen im Fluoreszenz-Scan und in der Coomassie-Färbung ähnliche Muster.

Eine Verknüpfung von Ketten miteinander bedeutet, dass die Ubiquitinierungskaskade von E1, E2 und E3 neben Monoubiquitin auch Ubiquitinketten aktivieren und auf einen Akzeptor übertragen kann. Beladungsreaktionen des E1-Enzyms mit K48- oder K63-verknüpften



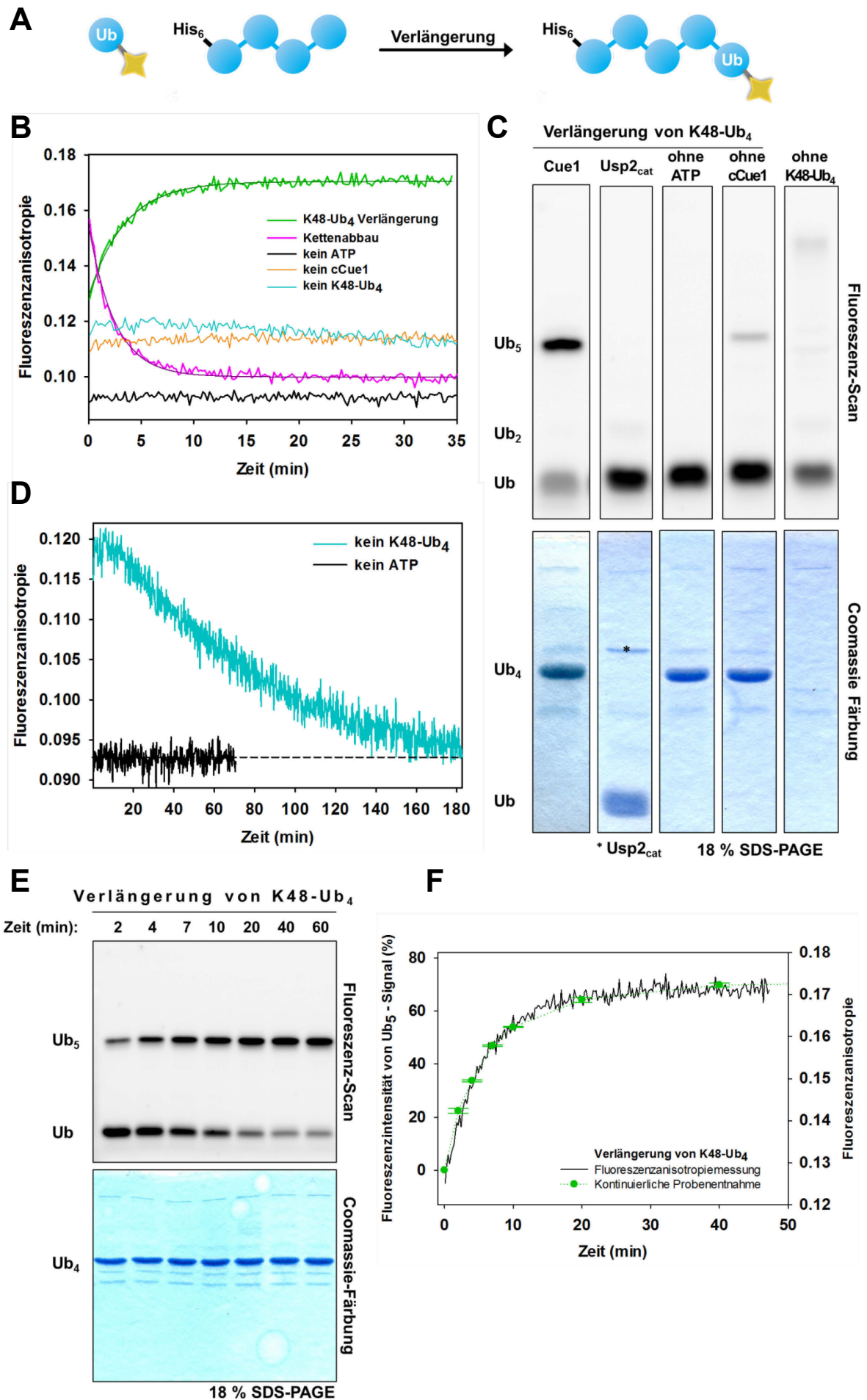


*In vitro* Ubiquitinierungen wurden angepasst, um die Verlängerung von Ubiquitinketten zu untersuchen. Die Reaktionen beinhalten vorgefertigte Ubiquitinketten, die mit einem blockierten C-Terminus Ketten-Ketten-Verknüpfungen verhindern und als Ubiquitinakzeptor dienen. Eine geringere Konzentration des fluoreszenzmarkierten Ubiquitinmonomers im Vergleich zu den eingesetzten Ketten (1:75) gewährleistet, dass die Verlängerung nur um eine Einheit erfolgt. In Abbildung 2-17 verfolgen Fluoreszenzanisotropiemessungen die Erweiterung von Tetra- zu Pentaubiquitin und zeigen einen Signalanstieg, der

monoexponentiell beschrieben werden kann. Eine Probe, die nach der Sättigung der Fluoreszenzanisotropie entnommen wurde, bestätigt im Fluoreszenz-Scan eine Verlängerung um ein Monomer. Eine anschließende Zugabe von Usp2<sub>cat</sub>, der katalytischen Domäne des deubiquitinierenden Enzyms Usp2, lässt die Anisotropiewerte annähernd auf das Niveau einer Reaktion ohne ATP abfallen. Die Ubiquitinketten werden fast vollständig in Monomere gespalten. In Abwesenheit von ATP sind die Signale unverändert, da Ubiquitin nicht aktiviert und folglich nicht verknüpft wird.

Befinden sich keine Ketten in den Reaktionen, nimmt die anfänglich leicht erhöhte Fluoreszenzanisotropie langsam ab. Vermutlich verfolgt das abfallende Signal die Dissoziation des Ubiquitinmoleküls (8,6 kDa) von dem E1-Enzym (120 kDa). Die in geringen Mengen entstandenen hochmolekularen Ketten leisten vermutlich aufgrund der bereits erwähnten Eigenfluoreszenzlöschung einen unerheblichen Beitrag zu dem Signal. Die Reaktion ist sehr langsam, da die Ubiquitinkonzentration sehr gering ist.

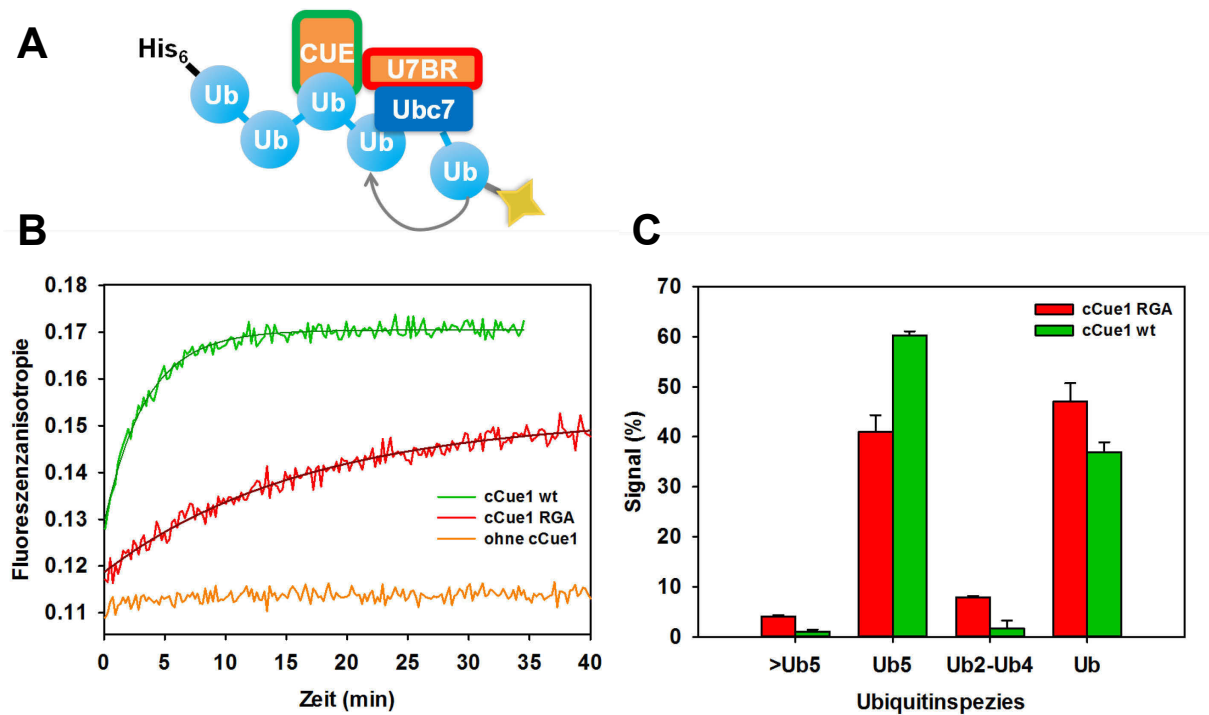
Der zeitliche Verlauf von Verlängerungsreaktionen kann ebenfalls durch eine kontinuierliche Probenentnahme, gefolgt von SDS-PAGE und Fluoreszenz-Scanning/Coomassie-Färbung aufgezeichnet werden (Abbildung 2-17 E). Die Kinetiken beider Methoden sind kongruent, wobei Fluoreszenzanisotropiemessungen eine wesentlich höhere Auflösung bieten (Abbildung 2-17 F).



**Abbildung 2-17: Fluoreszenzanisotropiemessungen verfolgen Verlängerungsreaktionen von Ubiquitinketten.** (A) Im Folgenden wird die Verlängerung von K48-Tetraubiquitin um eine fluoreszenzmarkierte Ubiquitineinheit untersucht. Ketten-Ketten-Verknüpfungen werden durch eine His<sub>6</sub>-Markierung am C-Terminus des Tetramers verhindert. (B) Die Kinetiken der Verlängerung von Tetraubiquitin durch cCue1/Ubc7/cHrd1 (—), des Kettenabbaus durch das deubiquitinierende Enzym Usp2<sub>cat</sub> (—) und von Kontrollreaktionen ohne ATP (—) oder ohne Ketten (—) wurden bei 20 °C gemessen. Das Anisotropiesignal steigt bei einer Kettenverlängerung, sinkt bei einem Kettenabbau und ist im zeitlichen Rahmen der Kontrollreaktionen gleichbleibend. (C) Die Reaktionsprodukte sowie Monoubiquitin sind im Fluoreszenz-Scan nach einer SDS-PAGE dargestellt. In der Coomassie-Färbung ist vorwiegend das im Überschuss eingesetzte Ub<sub>4</sub> zu erkennen. (D) Die Fluoreszenz-anisotropie sinkt in Reaktionen ohne Ketten (—) langsam auf das Niveau des konstanten Signals der Reaktion ohne ATP (—). (E) Der Fluoreszenz-Scan und die Coomassie-Färbung zeigen kontinuierlich entnommene Proben einer Verlängerungsreaktion von Ub<sub>4</sub> bei 20 °C. Die Fluoreszenzintensitäten von drei Wiederholungsexperimenten wurden quantifiziert (F, ●). (F) Die Kinetiken der Verlängerungsreaktionen von Ub<sub>4</sub> durch cCue1/Ubc7 wurden anhand einer Fluoreszenzanisotropiemessung (—) und mittels einer kontinuierlichen Probenentnahme (●) verfolgt und sind vergleichend dargestellt.

### 2.1.8 cCue1 stimuliert die Verlängerung von Ubiquitinketten durch Ubc7

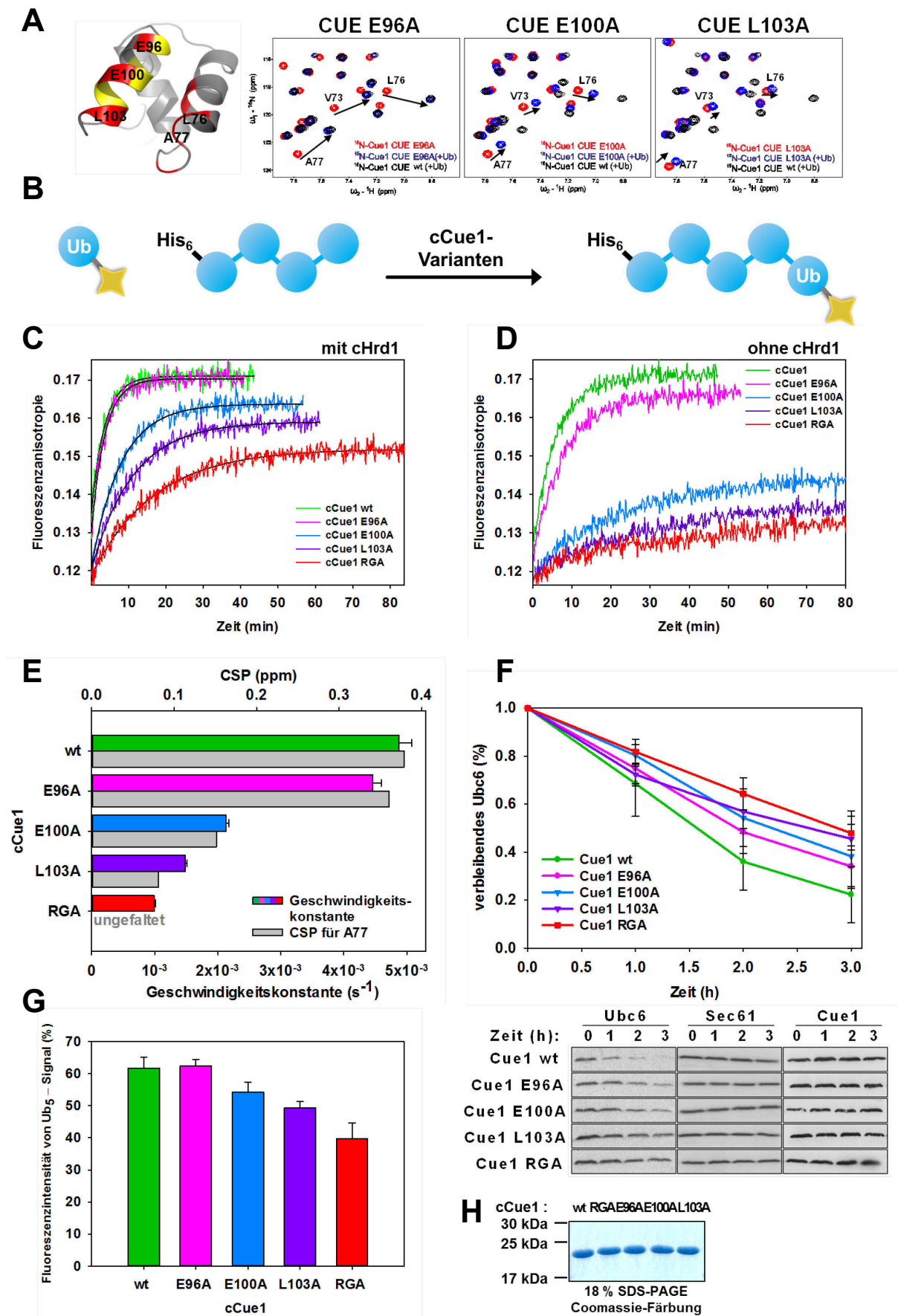
Verlängerungsreaktionen von Tetraubiquitin verdeutlichen den stimulierenden Effekt der beiden funktionellen Domänen von Cue1 (Abbildung 2-18 A, B). Sind die U7BR und die CUE-Domäne intakt, wird Ub<sub>5</sub> am schnellsten gebildet. In Abwesenheit der UBD ist die Reaktion stark verlangsamt und ineffizient. Es werden weniger Ubiquitineinheiten verknüpft und neben dem Hauptprodukt Pentaubiquitin entstehen im Vergleich zu der Reaktion mit aktiver CUE-Domäne mehr hoch- und niedermolekulare Konjugate (Abbildung 2-18 C). Fehlt sowohl die Aktivierung von Ubc7 als auch die Ubiquitinbindung ist die Kettenverlängerung sehr stark verlangsamt und anhand der Fluoreszenzanisotropie nicht messbar.



**Abbildung 2-18: Zwei funktionelle Domänen von Cue1 — U7BR und CUE — stimulieren die Verlängerung von Ubiquitinketten.** (A) Schematisch dargestellt ist das Arbeitsmodell der Kettenverlängerung durch cCue1/Ubc7. Die U7BR aktiviert Ubc7 und die CUE-Domäne bindet Ubiquitinketten. Das E2-Enzym überträgt eine Ubiquitineinheit auf Tetraubiquitin. (B) Die Kinetiken der Verlängerung von Ub<sub>4</sub> durch Ubc7/cHrd1 mit cCue1 (—), cCue1 RGA (—) oder ohne cCue1 (—) wurden bei 20 °C gemessen. Reaktionen mit funktioneller U7BR und CUE-Domäne laufen am schnellsten ab, gefolgt von Experimenten mit cCue1 RGA. Eine Kettenverlängerung in Abwesenheit von cCue1 ist mittels Fluoreszenzanisotropie nicht messbar. (C) Das Profil der fluoreszierenden Ubiquitinspezies nach der Sättigung der Verlängerungsreaktionen von Ub<sub>4</sub> mit cCue1 (■) oder cCue1 RGA (■) zeigt in Anwesenheit der CUE-Domäne mehr Ubiquitinkonjugate. Im Vergleich zu Reaktionen mit cCue1RGA entstehen neben dem Hauptprodukt Pentaubiquitin weniger Nebenprodukte.

### **2.1.8.1 Die Bindungsaffinität der Cue1-CUE-Domäne korreliert mit der Geschwindigkeit der Kettenverlängerung *in vitro* und dem Substratabbau *in vivo***

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dötsch (Goethe Universität, Frankfurt/Main) wurden die Struktur der Cue1-CUE-Domäne bestimmt und die Wechselwirkung mit Ubiquitin untersucht. Die UBD nimmt eine für CUE-Domänen typische *three-helix bundle* Faltung ein (Daten nicht gezeigt). Einige an der Ubiquitinbindung beteiligten Aminosäuren wurden zu Alaninresten ausgetauscht (E96A, E100A, L103A) und so Cue1-Varianten mit abnehmender Bindungsaffinität erstellt. NMR-Titrationsexperimente der Varianten mit Ubiquitin belegen anhand von verringerten *Chemical Shift Perturbations* (CPS) eine schwächere Wechselwirkung (Abbildung 2-19 A). Als nächstes wurden Verlängerungsexperimente von Ub<sub>4</sub> durchgeführt. Die Reinheit und Konzentration der verwendeten cCue1-Proteine wurden durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft (Abbildung 2-19 H). Die Kinetiken der Verlängerungsreaktionen ergeben eine Abnahme der Geschwindigkeitskonstanten mit sinkenden Bindungsaffinitäten der cCue1-Varianten (Abbildung 2-19 E). Diese Verlangsamung der Kettenverlängerung ist sowohl in Ansätzen mit als auch ohne cHrd1 zu beobachten (Abbildung 2-19 C, D). Der stimulierende Effekt der CUE-Domäne scheint ungeachtet der RING-Domäne zu bestehen. Zusätzlich wirkt sich eine schwächere Ubiquitinbindung auf die Effizienz der Verlängerungsreaktion aus. Mit einer abnehmenden Bindungsaffinität der CUE-Domäne wird weniger Pentaubiquitin gebildet (Abbildung 2-19 G). Zuletzt wurden die Cue1-Varianten *in vivo* untersucht. Das E2-Enzym Ubc6 ist ein Substrat des Doa10-Ubiquitinligase-Komplexes und wird abhängig von Cue1/Ubc7 proteasomal abgebaut. Eine schwächere Ubiquitinbindung der Cue1-Varianten bewirkt im Einklang mit einer langsameren Polyubiquitinierung einen verzögerten Abbau von Ubc6 in Hefe (Abbildung 2-19 F).



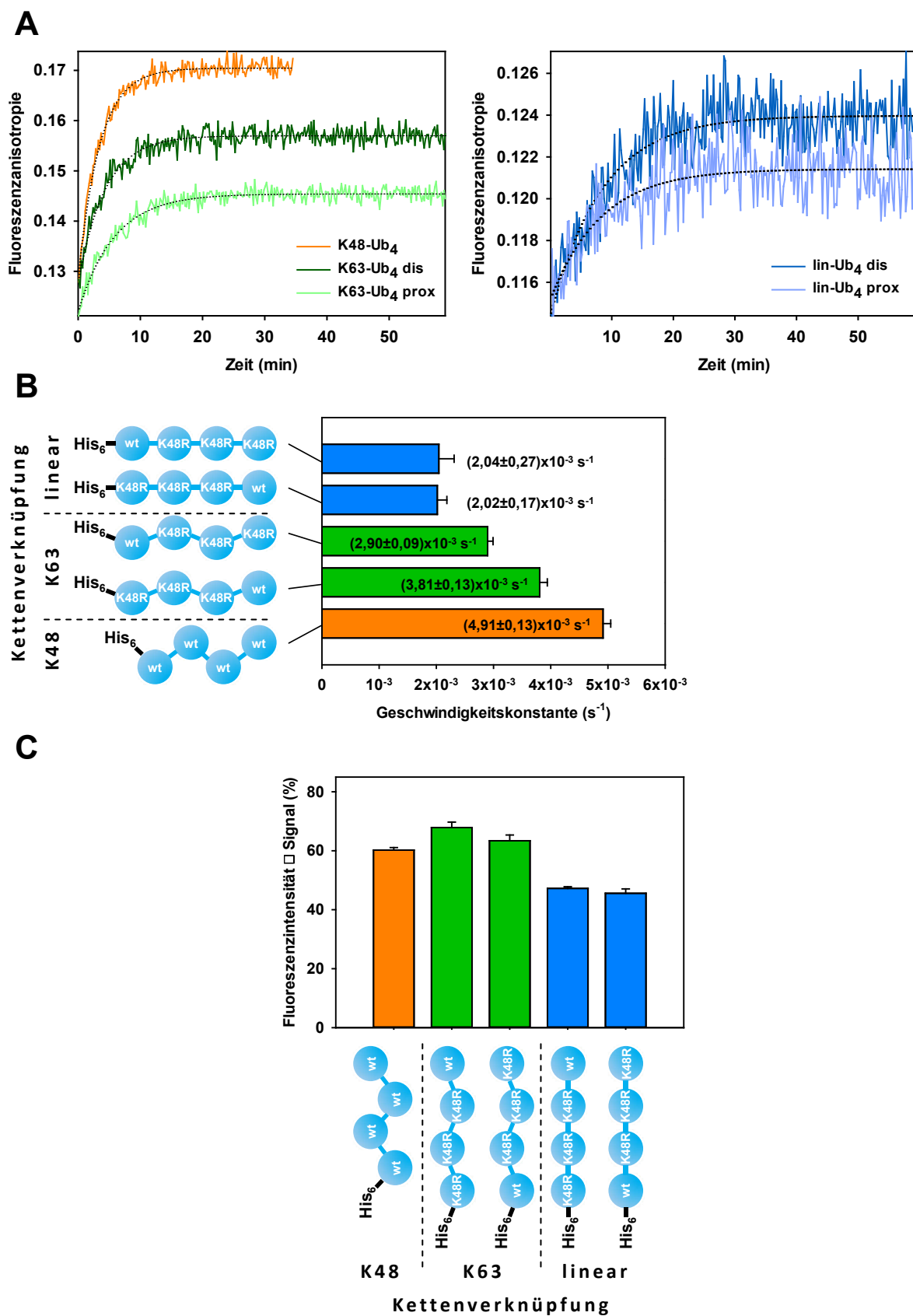


**Abbildung 2-19: Die Bindungsaffinität der CUE-Domäne, die Geschwindigkeit der Kettenverlängerung *in vitro* und die Geschwindigkeit des Substratabbaus *in vivo* korrelieren.** (A) Basierend auf Bindungsstudien der CUE-Domäne wurden cCue1-Varianten mit einer abnehmenden Bindungsaffinität erstellt. NMR-Titrationsexperimente der CUE-Varianten mit Ubiquitin, die in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dötsch durchgeführt wurden, zeigen reduzierte *Chemical Shift Perturbations* (CSP) und bestätigen eine geschwächte Ubiquitinbindung. Die CSPs für A77 sind in (E) zusammengefasst. Mit einer abnehmenden Bindungsstärke ergibt sich die folgende Reihenfolge der cCue1-Varianten: cCue1 wt (■), cCue1 E96A (■), cCue1 E100A (■), cCue1 L103A (■) und cCue1 RGA (■). (B) Die cCue1-Varianten wurden in Verlängerungsreaktionen von K48-Tetraubiquitin mittels Fluoreszenzanisotropie untersucht. Gezeigt sind die Kinetiken der Reaktionen mit cCue1-Varianten und Ubc7 bei 20 °C in An- (C) und Abwesenheit von cHrd1 (D). (E) Die Geschwindigkeitskonstanten der Verlängerungsreaktionen (farbig) sind im Vergleich zu den CSPs der Bindungsexperimente (■) dargestellt. (F) Cycloheximid-Abbauxperiment von Ubc6 in Anwesenheit der Cue1-Varianten. Eine schwächere Ubiquitinbindung der CUE-Domäne verlangsamt den Abbau von Ubc6 *in vivo*. Das E2-Enzym ist ein Substrat des Ubc7/Doa10-vermittelten ERAD. Die Mengen der Cue1-Varianten sind vergleichbar und über den Zeitraum des Experiments gleichbleibend. Sec61 dient als Ladekontrolle. (G) Dargestellt ist die Quantifizierung des Pentaubiquitinsignals in Fluoreszenz-Scans nach der Sättigung der Verlängerungsreaktionen in (C). (H) Die Reinheit und Konzentration der cCue1-Varianten, die in den Verlängerungsexperimenten untersucht wurden, wurden durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft.

### 2.1.8.2 Die Art der Kettenverknüpfung beeinflusst die Kettenverlängerung

Das E2-System cCue1/Ubc7 verknüpft Ubiquitineinheiten über den K48-Rest des Akzeptormoleküls, wodurch homotypische Ubiquitinketten gebildet werden. Beeinflusst die Konformation der bereits existierenden Ubiquitinkette die Verlängerungsreaktion? In den folgenden Reaktionen wurden linear-, K48- und K63-verknüpfte Tetraubiquitinmoleküle als Substrate für eine Verlängerung durch cCue1/Ubc7/cHrd1 eingesetzt. K48-Ketten besitzen stets einen freien K48-Rest, während die andersartig verknüpften Moleküle vier freie K48-Verknüpfungspunkte bereitstellen. Um die Verlängerungsreaktionen vergleichbar zu machen, sind die linearen und K63-verknüpften Ketten auf einen endständigen K48-Rest beschränkt. K48R-Aminosäureaustausche blockieren die Verknüpfungsstellen in den restlichen Ubiquitineinheiten. Die Kinetiken der Verlängerungsreaktionen und die errechneten Geschwindigkeitskonstanten zeigen einen deutlichen Einfluss der Verknüpfungsart der zu verlängernden Ketten auf die Reaktionsgeschwindigkeit (Abbildung 2-20 A, B). Die Erweiterung von K48-Ub<sub>4</sub> erfolgt am schnellsten, gefolgt von K63-Ketten, die am distalen Ubiquitinmolekül schneller verlängert werden als am proximalen Ende. Lineare Ketten werden ohne eine distale oder proximale Präferenz am langsamsten und ineffizientesten verlängert (Abbildung 2-20 C).

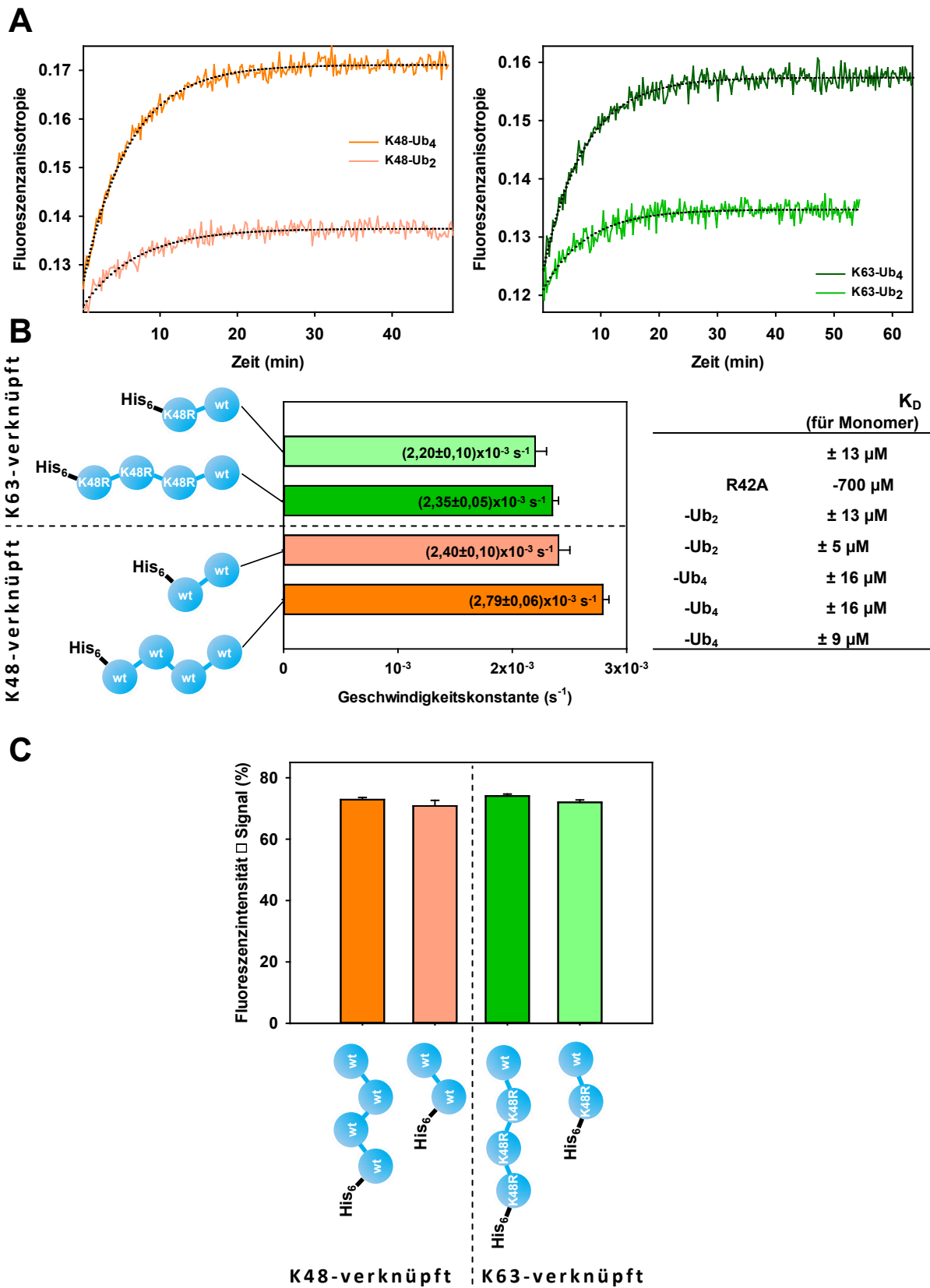




**Abbildung 2-20: Die Art der Kettenverknüpfung beeinflusst die Geschwindigkeit der K48-abhängigen Kettenverlängerung durch cCue1/Ubc7/cHrd1.** (A) Die Kinetiken der Verlängerungsreaktionen von Tetraubiquitin, dessen Monomere über K48 (■) oder K63 (■) oder den N-Terminus/M1 (■) verknüpft sind, wurden bei 20 °C verfolgt. Lineares und K63-verknüpftes Ub<sub>4</sub> sind durch Ubiquitinvarianten mit K48R-Substitutionen eingeschränkt, entweder an der distalen (N-terminalen) oder proximalen (C-terminalen) Ubiquitineinheit verlängert zu werden. (B) Die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen verdeutlichen, dass K48-Ub<sub>4</sub> am schnellsten verlängert wird, gefolgt von K63-Ub<sub>4</sub>. Lineares Ub<sub>4</sub> wird am langsamsten umgesetzt. Bei einer K63-Verknüpfung wird eine distale Verlängerung einer proximalen bevorzugt. (C) Während die Ausbeuten von entstandenen Pentaubiquitin bei Ketten mit einer Verknüpfungen über K48 und K63 ähnlich ausfallen, wird lineares Ub<sub>4</sub> mit weniger Ubiquitinmolekülen erweitert.

### 2.1.8.3 Die Länge einer Ubiquitinkette beeinflusst die Kettenverlängerung

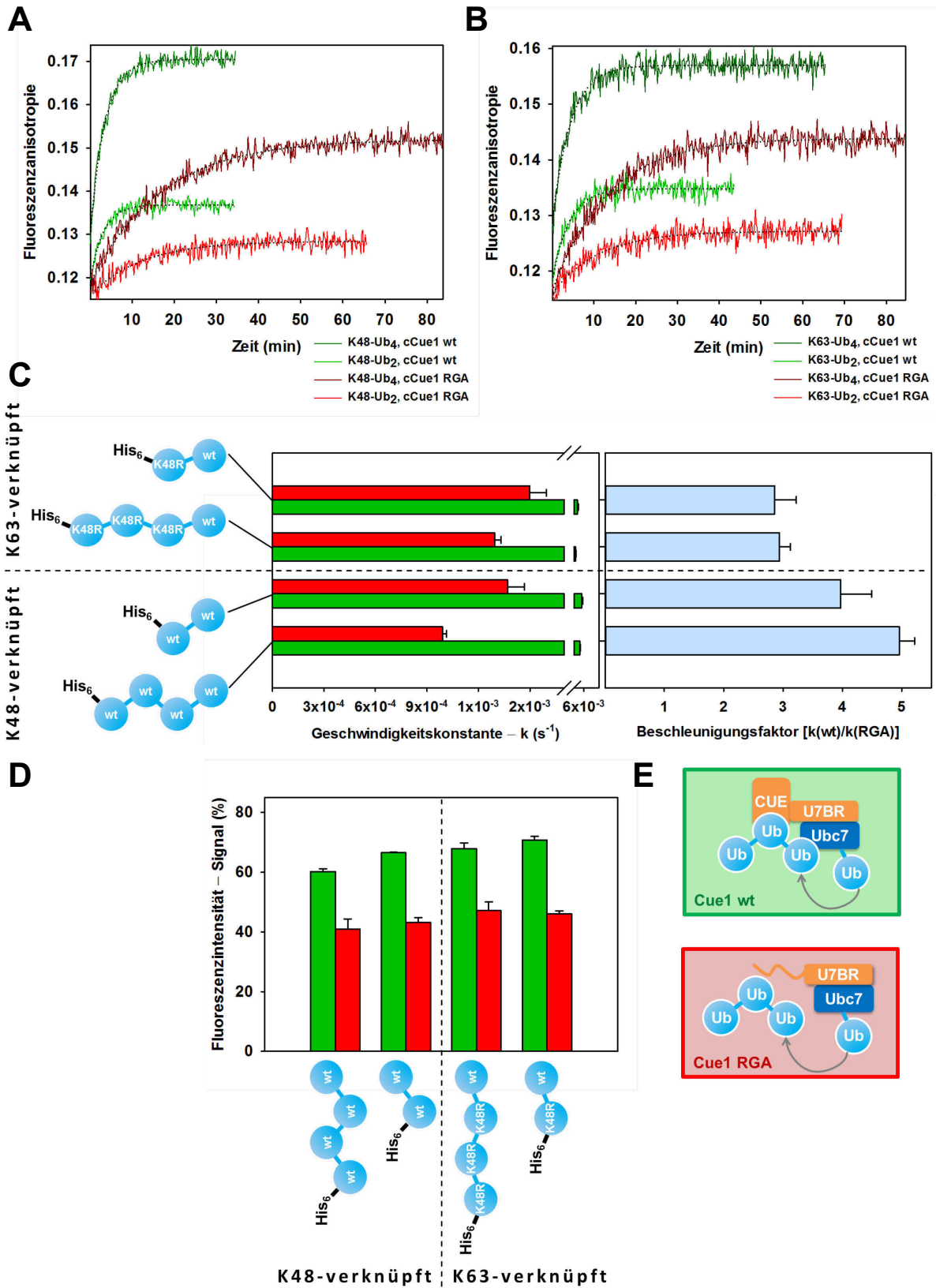
In weiteren Experimenten wurden K48- und K63-verknüpfte Di- und Tetraubiquitinmoleküle durch cCue1/Ubc7 verlängert. Während die Ausbeute von Pentaubiquitin vergleichbar ist (Abbildung 2-21 C), beeinflusst die Länge des Substrates die Geschwindigkeit der Verlängerungsreaktion. Je länger die Ubiquitinkette wird, desto schneller wird diese durch Ubc7 zusammen mit cCue1 erweitert. Bei einer K48-Verknüpfung fällt die Beschleunigung mit wachsender Kettenlänge größer aus als bei K63-Oligomeren. Die Geschwindigkeitskonstanten der Verlängerungsreaktionen korrelieren mit den Bindungsaffinitäten der CUE-Domäne für die jeweiligen Ketten (Abbildung 2-21 B). Der Trend einer stärkeren Wechselwirkung der UBD mit zunehmender Kettenlänge spiegelt sich in schnelleren Verlängerungsreaktionen wider.



**Abbildung 2-21: Die Kettenlänge beeinflusst die Geschwindigkeit der Kettenverlängerung durch cCue1/Ubc7.** (A) Die Kinetiken der Verlängerungsreaktionen von Di- oder Tetraubiquitinmolekülen, die über K48 (■) oder K63 (■) verknüpft sind, wurden bei 20 °C mittels Fluoreszenzanisotropie verfolgt. (B) Die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen korrelieren mit den Bindungsaffinitäten der CUE-Domäne für die entsprechenden Ketten. Die  $K_D$ -Werte wurden anhand von *Surface Plasmon Resonance* (SPR) Experimenten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dötsch bestimmt und sind unter Annahme einer gleichartigen Bindung der Ubiquitineinheiten in einer Kette für ein Monomer angegeben. (C) Die Menge an gebildeten Verlängerungsprodukten wurde durch SDS-PAGE und Fluoreszenz-Scanning überprüft.

### 2.1.8.4 Quantifizierung der Beschleunigung von Verlängerungsreaktionen durch die Cue1-CUE-Domäne

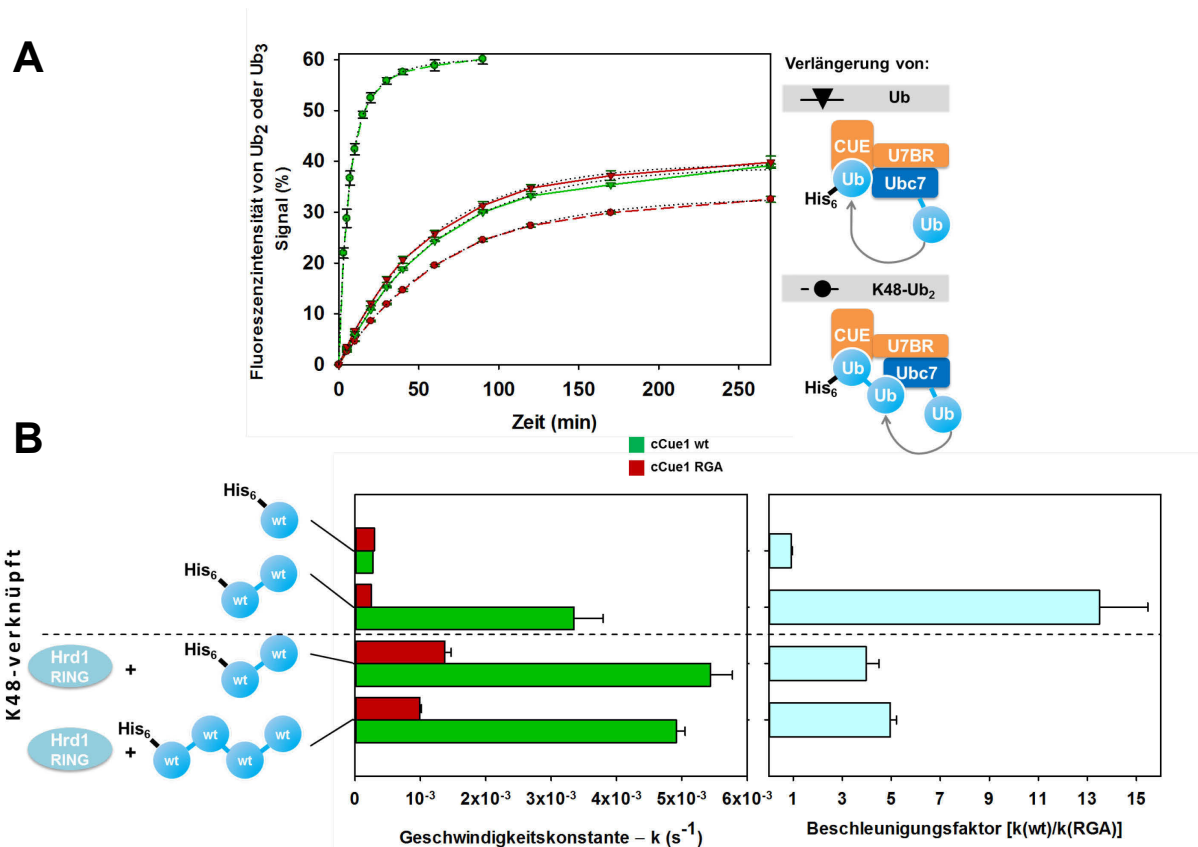
Die Stimulation der Kettenverlängerung durch die CUE-Domäne kann durch einen Vergleich von Reaktionen in An- und Abwesenheit der UBD bewertet werden (Abbildung 2-22). Experimente mit cCue1 RGA und verschiedenen Substratketten ergeben unterschiedliche Geschwindigkeitskonstanten, weshalb der Effekt der CUE-Domäne nicht durch einen direkten Vergleich von Reaktionen in Anwesenheit der Domäne ersichtlich wird. Mithilfe einer Normierung kann die CUE-abhängige Beschleunigung der entsprechenden Verlängerungsreaktion berechnet werden. Der Beschleunigungsfaktor ist der Quotient aus den Geschwindigkeitskonstanten von Reaktionen mit (cCue1 wt) und ohne die UBD (cCue1 RGA). Interessant ist die Tendenz, dass Ubc7 in Abwesenheit der CUE-Domäne Ketten mit zunehmender Länge langsamer verlängert, jedoch das Maß der Beschleunigung durch die CUE-Domäne mit wachsenden Ketten steigt. Bei K63-verknüpften Oligomeren scheint die Stärke der Stimulation unabhängig von der Größe des Substrates zu sein.



**Abbildung 2-22: Quantifizierung der Beschleunigung der Kettenverlängerung durch die CUE-Domäne von Cue1.** Verlängerungsreaktionen von Ketten mit unterschiedlicher Verknüpfungsart und Länge sind vergleichend mit (cCue1 wt, ■) und ohne funktioneller CUE-Domäne (cCue1 RGA, ■) gezeigt. Anhand der Kinetiken der distalen Kettenverlängerungen von K48- (A) und K63-verknüpftem (B) Ub<sub>2</sub> und Ub<sub>4</sub> durch cCue1 (wt oder RGA)/Ubc7 und cHrd1 wurden die Geschwindigkeitskonstanten (k) der Reaktionen bei 20 °C bestimmt (C). Die CUE-abhängige Beschleunigung ist als Beschleunigungsfaktor veranschaulicht, der mit  $k(\text{cCue1 wt})/k(\text{cCue1 RGA})$  das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten von Reaktionen mit und ohne die CUE-Domäne beschreibt. (D) Die Ausbeuten an Verlängerungsprodukten der einzelnen Reaktionen sind vergleichend zusammengefasst. Proben wurden nach der Sättigung der Reaktionen entnommen und durch SDS-PAGE und Fluoreszenz-Scanning überprüft. (E) Die Kettenverlängerung durch cCue1/Ubc7 ist mit und ohne einer funktionellen CUE-Domäne schematisch dargestellt.

### 2.1.8.5 Die CUE-Domäne stimuliert die Verlängerung von Ubiquitinketten, nicht aber von Monoubiquitin

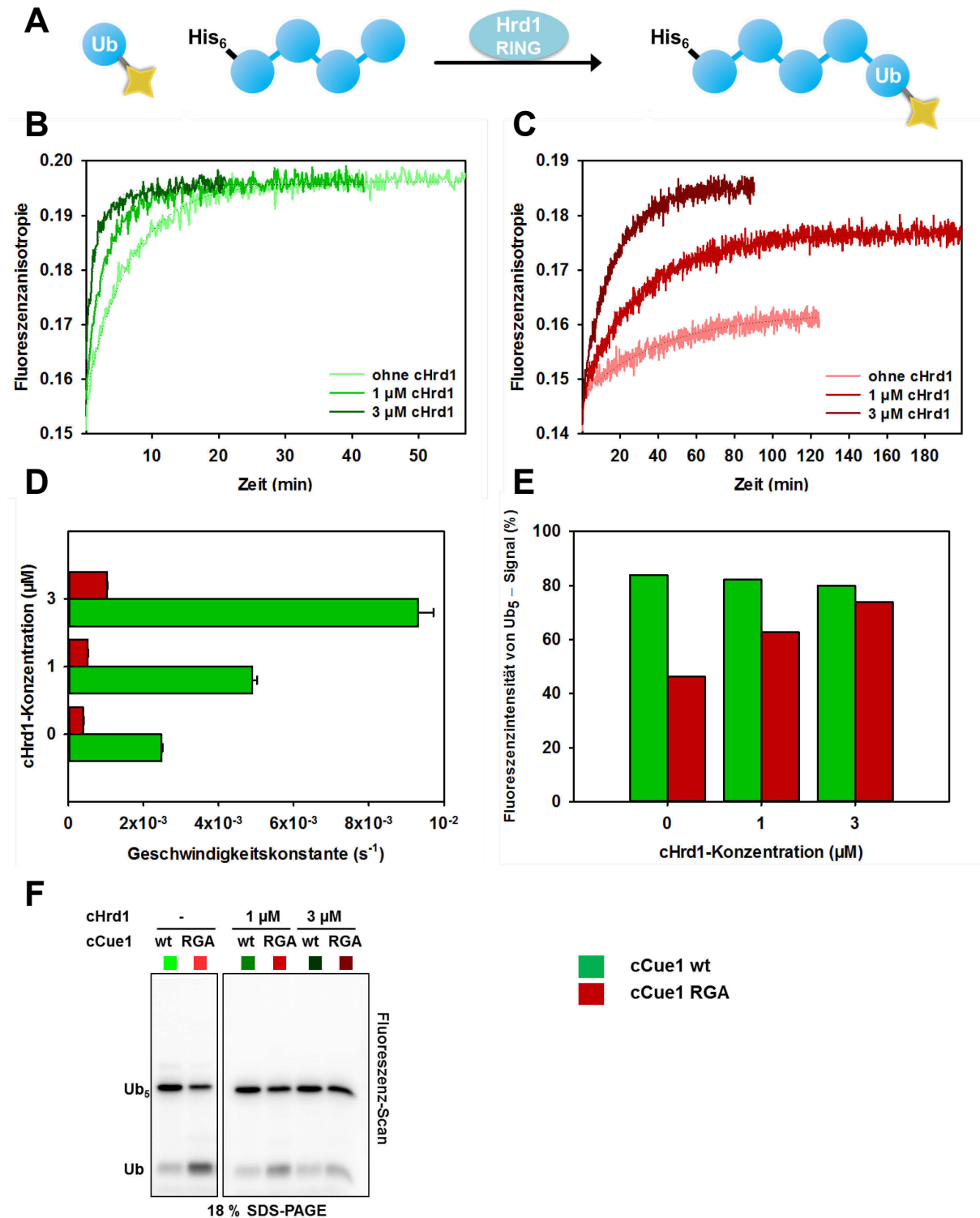
In den bisher durchgeführten Verlängerungsexperimenten mit Ubiquitinketten wurde stets eine beschleunigende Wirkung der CUE-Domäne festgestellt. Einzigartig hierzu grenzen sich Verlängerungsreaktionen mit Monoubiquitin ab, die keine Stimulation durch die CUE-Domäne erkennen lassen (Abbildung 2-23 A). Das verwendete Monoubiquitin ist analog zu den Ketten C-terminal blockiert. Bindet die CUE-Domäne ein Ubiquitinmolekül, das gleichzeitig verlängert werden soll, scheint die Wechselwirkung die Reaktion sogar marginal zu stören. Hingegen wird die Verlängerung von Diubiquitin durch cCue1/Ubc7 mit einem Faktor von 13 stark beschleunigt (Abbildung 2-23 B). In Anwesenheit der Hrd1-RING-Domäne verringert sich die Beschleunigung dieser Reaktion auf ein Vierfaches. Die Verlängerung von Tetraubiquitin ist aufgrund der UBD 5fach schneller. cHrd1 erleichtert die Verlängerung von Ubiquitinketten durch cCue1/Ubc7 und scheint den Effekt der CUE-Domäne zu maskieren.



**Abbildung 2-23: Die CUE-Domäne beschleunigt die Verlängerung von Ketten, aber nicht von Monoubiquitin. In Anwesenheit der Hrd1-RING-Domäne verringert sich der stimulierende Effekt der CUE-Domäne.** (A) Kontinuierliche Probenentnahmen verfolgen die Verlängerungsreaktionen von Mono- (▼) und Diubiquitin (●) in Anwesenheit von cCue1 wt (■) oder Cue1 RGA (■) bei 20 °C. (B) Die Geschwindigkeitskonstanten und CUE-abhängigen Beschleunigungsfaktoren ausgewählter Verlängerungsexperimente sind in Anlehnung an Abbildung 2-22 zusammengefasst. Die Reaktionen mit Monoubiquitin und unterschiedlichen Ketten wurden in An- und Abwesenheit von cHrd1 bei 20 °C durchgeführt.

#### 2.1.8.6 Die Hrd1-RING-Domäne unterstützt die Kettenverlängerung durch cCue1/Ubc7

Steigende cHrd1-Konzentrationen beschleunigen die Verlängerung von Tetraubiquitin in Reaktionen mit cCue1/Ubc7 in An- und Abwesenheit der funktionellen CUE-Domäne (Abbildung 2-24 B bzw. C oder D). In Reaktionen mit cCue1 und zunehmenden cHrd1-Konzentrationen sinkt die Menge an gebildeten Pentaubiquitin geringfügig (Abbildung 2-24 E, F). Ohne die CUE- und RING-Domäne ist die Ausbeute an Verlängerungsprodukt etwa halbmaximal im Vergleich zu Reaktionen mit cCue1 und steigt bei vermehrter Zugabe von cHrd1 auf annähernd maximale Mengen.

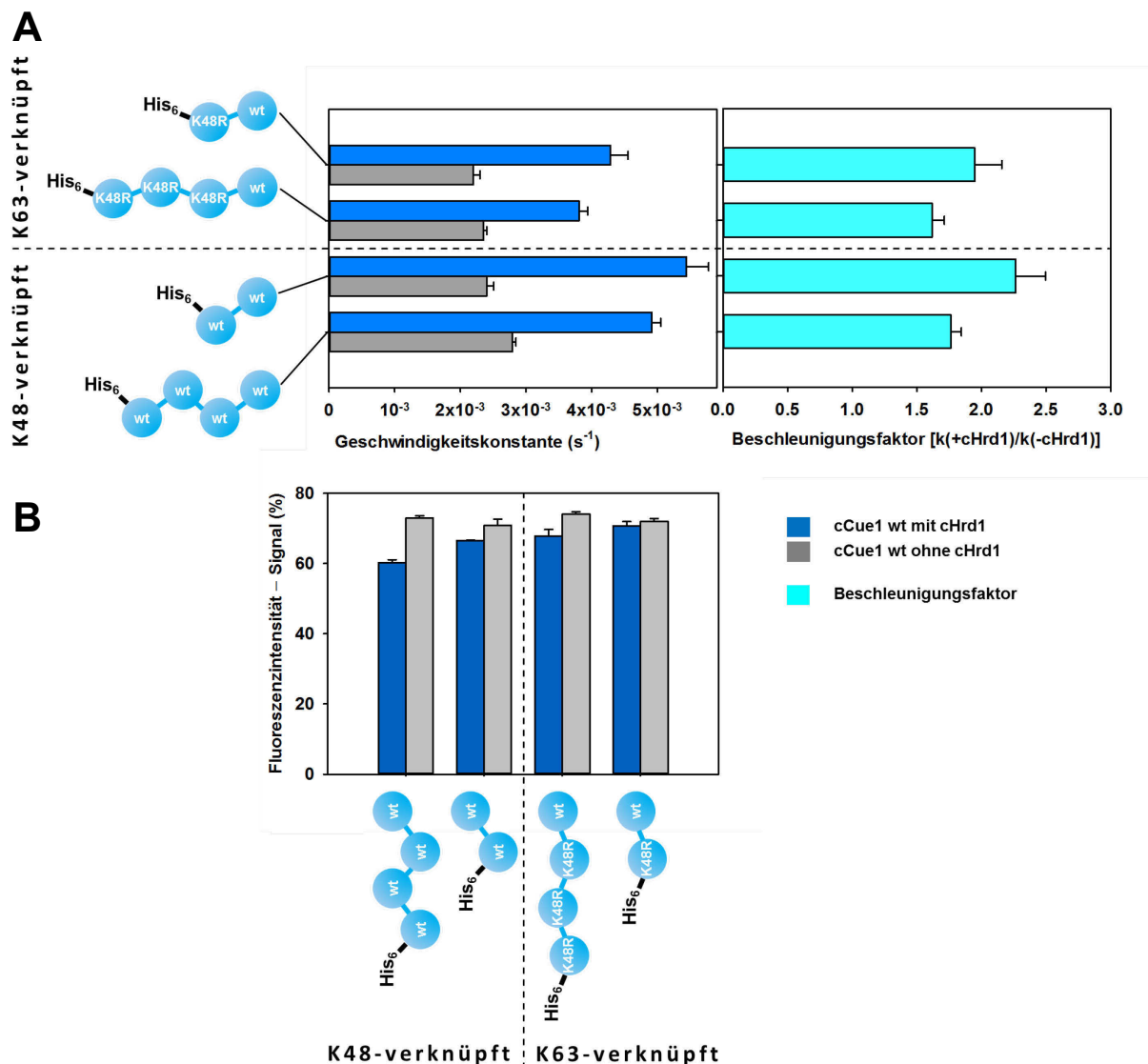


**Abbildung 2-24: Die Hrd1-RING-Domäne beschleunigt die Kettenverlängerung durch cCue1/Ubc7 und erhöht die Ausbeute an Verlängerungsprodukt in Reaktionen mit Cue1 RGA.** (A) Verlängerungsreaktionen von Ub<sub>4</sub> werden mit unterschiedlichen Konzentrationen von cHrd1 untersucht. Die Kinetiken der Reaktionen ohne, mit 1 µM oder 3 µM cHrd1 wurden in Anwesenheit von cCue1 wt (B, ■) oder Cue1 RGA (C, ■) bei 20 °C verfolgt. Die Geschwindigkeitskonstanten (D) und die Ausbeuten an gebildeten Pentaubiquitin (E) sind für die eingesetzten cHrd1-Konzentrationen vergleichend zusammengefasst. (F) Proben wurden nach der Sättigung der Reaktionen entnommen und mittels SDS-PAGE und Fluoreszenz-Scanning überprüft.



Je größer die zu verlängernde Kette ist, desto stärker stimuliert die CUE-Domäne die Verlängerungsreaktion. Die Wirkung der Hrd1-RING-Domäne ist ebenfalls abhängig von der Kettenlänge, folgt jedoch einem umgekehrten Zusammenhang (Abbildung 2-25). Sowohl bei einer K48- als auch bei einer K63-Verknüpfung nimmt die Beschleunigung durch cHrd1 mit einer steigenden Anzahl an Monomeren einer Kette ab.

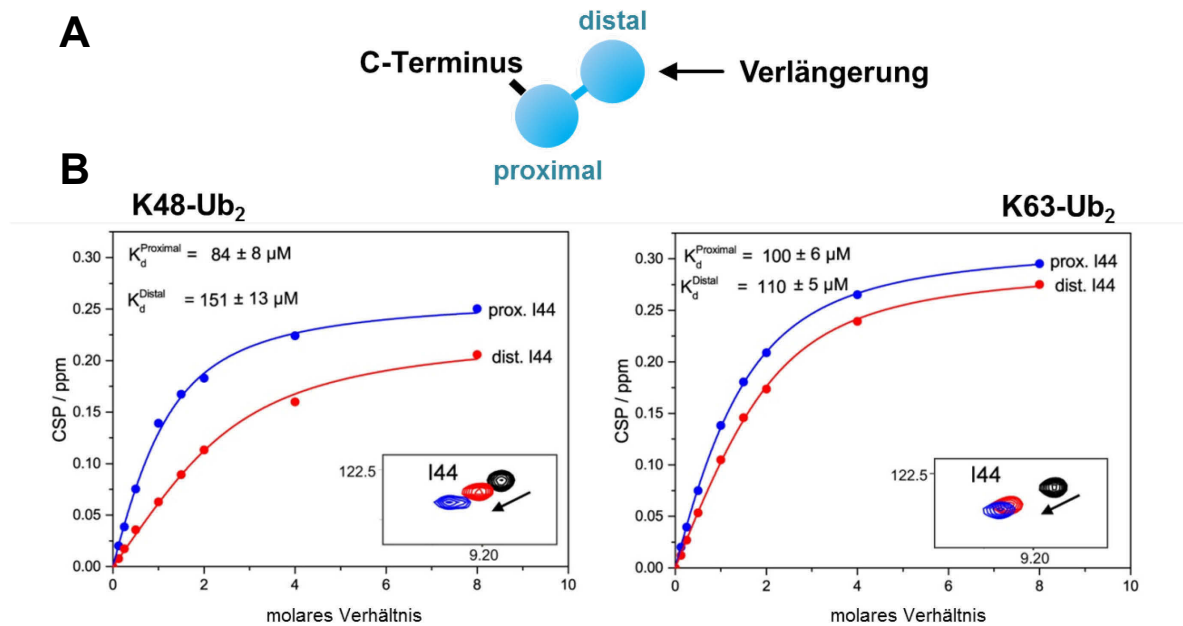
Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl die CUE- als auch RING-Domäne die Verlängerung von Ubiquitinketten vorantreiben. Die Beschleunigung scheint abhängig von der Länge der zu erweiternden Kette unterschiedlich stark ausgeprägt zu sein. Während die RING-Domäne vorwiegend bei kürzeren Oligomeren stimulierend wirkt, beschleunigt die CUE-Domäne vermehrt die Verlängerung längerer Ketten.



**Abbildung 2-25: Die Beschleunigung der Kettenverlängerung durch die Hrd1-RING-Domäne nimmt mit zunehmender Kettenlänge ab.** (A) Die Geschwindigkeitskonstanten von Kettenverlängerungen mit cCue1/Ubc7 sind in An- (■) und Abwesenheit (▒) von cHrd1 gezeigt. Die RING-abhängigen Beschleunigungsfaktoren (■) entsprechen den Verhältnissen der Geschwindigkeitskonstanten von Reaktionen mit und ohne cHrd1 —  $k(+cHrd1)/k(-cHrd1)$ . (B) Die Ausbeuten an Verlängerungsprodukten sind im Vergleich dargestellt. Proben wurden nach der Sättigung der Reaktionen bei 20 °C entnommen und durch SDS-PAGE und Fluoreszenz-Scanning untersucht.

### 2.1.8.7 Die Cue1-CUE-Domäne bindet die proximale Einheit von K48-Diubiquitin stärker als das distale Ubiquitinmolekül

Die Wechselwirkung der CUE-Domäne mit den einzelnen Monomeren von Diubiquitin wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dötsch untersucht. Hierfür wurden K48- oder K63-verknüpfte Dimere hergestellt, deren distale oder proximale Ubiquitineinheiten  $^{15}\text{N}$ -markiert sind. NMR-basierte Titrationsexperimente mit nicht-markierter CUE-Domäne und den Diubiquitinmolekülen ermöglichen eine getrennte Untersuchung der Bindungsereignisse an beiden Positionen (Abbildung 2-26). Die Bindungsaffinitäten sind anhand der CSPs von Isoleucin 44 bestimmt und zeigen eine eindeutige Präferenz der CUE-Domäne für die proximale Ubiquitineinheit in K48-Ub<sub>2</sub>. Im Vergleich zu dem distalen Ubiquitinmolekül ist die Wechselwirkung mit der proximalen Einheit bei K48-Verknüpfung fast doppelt so stark ( $K_D^{\text{distal}} = 84 \pm 8 \mu\text{M}$ ;  $K_D^{\text{proximal}} = 151 \pm 13 \mu\text{M}$ ). Im Gegensatz dazu wurde kein abweichendes Bindungsverhalten der CUE-Domäne mit K63-Ub<sub>2</sub> beobachtet. Die Dissoziationskonstanten für die distale und proximale Einheit liegen jeweils im Bereich von 100  $\mu\text{M}$ .



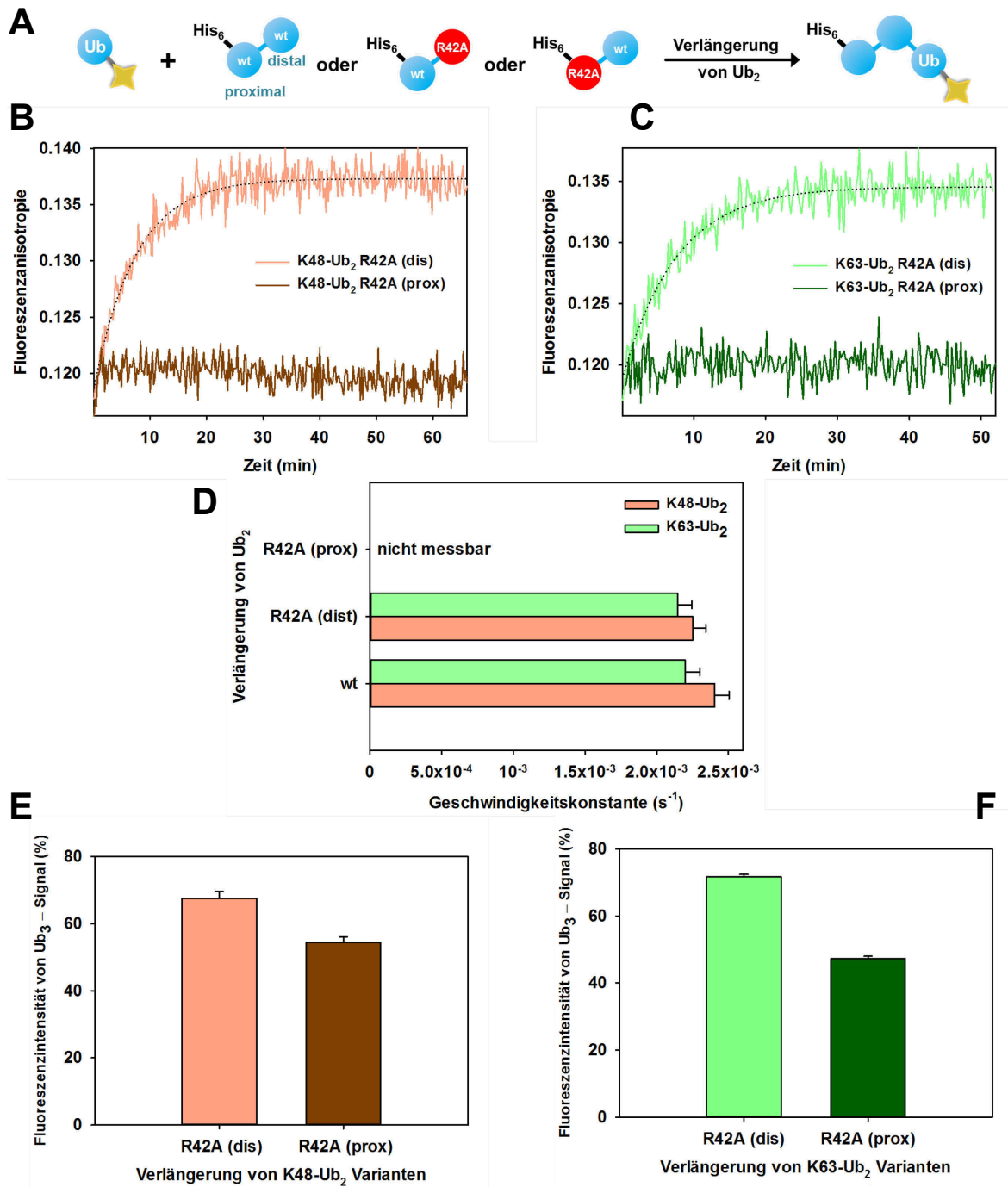
**Abbildung 2-26: Die CUE-Domäne bindet die proximale Ubiquitineinheiten in K48-verknüpftem Diubiquitin stärker als das distale Molekül. In K63-Ub<sub>2</sub> werden beide Monomere ähnlich stark gebunden.** (A) Ein ungebundenes Diubiquitinmolekül weist am proximalen Kettenende einen freien C-Terminus auf. Die distale Ubiquitineinheit dient bei homotypischer Verknüpfung als Ubiquitinakzeptor und wird verlängert. Eine präferentielle Wechselwirkung der CUE-Domäne mit der distalen oder proximalen Einheit von Diubiquitin kann mithilfe einer selektiven <sup>15</sup>N-Markierung der Ubiquitinmoleküle untersucht werden. (B) Die Bindungsaffinitäten der CUE-Domäne bezüglich der proximalen (—) oder distalen (—) Ubiquitineinheit in K48- oder K63-verknüpftem Ub<sub>2</sub> wurden mittels NMR-basierter Titrationsexperimente mit nicht-markierter CUE-Domäne in der Arbeitsgruppe von Prof. Dötsch bestimmt.

### 2.1.8.8 Die Wechselwirkung von cCue1 mit der proximalen Ubiquitineinheit von Diubiquitin stimuliert die Kettenverlängerung am stärksten

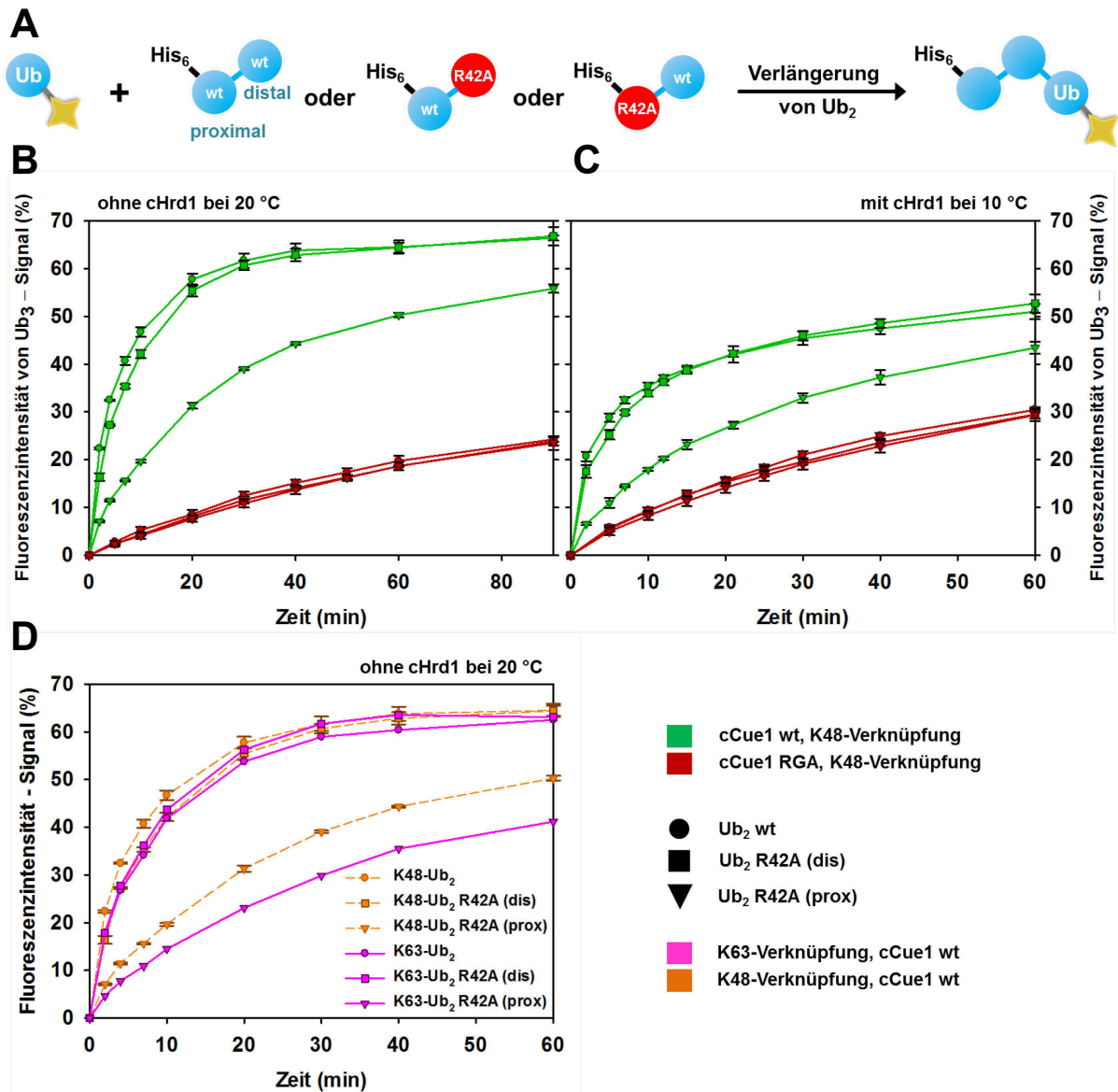
Die CUE-Domäne interagiert vorzugsweise mit K48-verknüpften Ubiquitineinheiten und bindet somit verstärkt K48-Ketten. Diese klare Bindungspräferenz innerhalb eines K48-Polymers führt zu einer höheren Population an proximal im Vergleich zu distal gebundenen Cue1. Ob diese gerichtete Positionierung von Cue1/Ubc7 förderlich für die Kettenverlängerung ist, wurde *in vitro* anhand der Ubiquitinvariante-R42A untersucht. Der Aminosäureaustausch schwächt die Wechselwirkung des Ubiquitinmoleküls mit der CUE-Domäne um etwa das Vierfache (Abbildung 2-21 B) und verlangsamt dadurch die Kettenverlängerung (Abbildung 2-29 A und B). Interessanterweise scheint die Position von R42A innerhalb der Kette einen Einfluss auf die Verlängerungskinetik zu haben. Je nachdem ob distal oder proximal platziert, verlangsamt die geschwächte Bindung die

Verlängerungsreaktion von Diubiquitin im unterschiedlichen Maße. Fluoreszenz-anisotropiemessungen zeigen den Unterschied in den Kinetiken unverhältnismäßig stark (Abbildung 2-27). Während eine distal eingeführte R42A-Variation die Verlängerung von Diubiquitin nur leicht verlangsamt, wird bei proximaler Substitution kein Signalanstieg detektiert. Entstandenes Triubiquitin befürwortet jedoch eine erfolgte Verlängerungsreaktion (Abbildung 2-27 E und F), die vermutlich zu langsam und ineffizient ausfällt, um mittels Fluoreszenz-anisotropie verfolgt zu werden. Verlängerungsexperimente, die durch eine kontinuierliche Probenentnahme untersucht wurden, vervollständigen die Ergebnisse (Abbildung 2-28) und zeigen ähnliche Kinetiken der Reaktionen mit *wildtyp* Diubiquitin und der Variante mit distalem R42A. Bei einer proximalen Schwächung der Bindung ist die Reaktion stark verlangsamt. Die Wechselwirkung der CUE-Domäne mit dem proximalen Ubiquitinmolekül scheint das E2-Enzym Ubc7 förderlich für eine distale Kettenverlängerung auszurichten. Zusätzlich wurden die gerade beschriebenen Experimente mit cCue1 RGA wiederholt. Identische Kinetiken implizieren, dass die Substitution-R42A die Aktivität des E2-Enzyms nicht beeinflusst. Die unterschiedlichen Geschwindigkeiten der Verlängerungsexperimente mit cCue1 sind somit spezifisch auf den Einfluss der CUE-Domäne zurückzuführen. Die cHrd1-RING-Domäne stimuliert die Verlängerungsreaktionen, wobei die Anordnung der Kinetiken ähnlich bleibt (Abbildung 2-28 B und C). Analog zu 2.1.8.1 besteht die beschleunigende Wirkung der UBD trotz der RING-Domäne. Eine proximale Bindung der CUE-Domäne wirkt sich auch bei einer K63-Verknüpfung positiv auf die Kettenverlängerung aus. Experimente mit Diubiquitin und Varianten, die über K48 oder K63 verknüpft sind, zeigen eine gleiche Abfolge der Kinetiken (Abbildung 2-28 D). Die Reaktionen mit K63-verknüpften Ketten sind aufgrund der schwächeren Bindung der CUE-Domäne allgemein langsamer.

Die Wechselwirkung von cCue1 mit verknüpften Ubiquitineinheiten (proximal bei Ub<sub>2</sub>) scheint unabhängig von der Verknüpfungsart die Kettenverlängerung stärker zu stimulieren als die Bindung des distalen Ubiquitinmoleküls. Bei K48-Ketten wird dieser Positionierungseffekt durch eine stärkere Interaktion der CUE-Domäne mit den K48-verknüpften/proximalen Ubiquitineinheiten verstärkt.



**Abbildung 2-27: Untersuchung des Einflusses der Wechselwirkung von cCue1 mit der distalen oder proximalen Einheit von Diubiquitin auf die Kettenverlängerung – Fluoreszenzanisotropiemessungen.** (A) Verlängerungsreaktionen von Ub<sub>2</sub> oder Ub<sub>2</sub>-Varianten mit distaler oder proximaler R42A-Substitution wurden mittels Fluoreszenzanisotropie untersucht. Die Ubiquitinvariante mit R42A wird schwächer von der CUE-Domäne gebunden ( $K_D \sim 600-700 \mu M$ , Abbildung 2-21 B). Die Kinetiken der Verlängerungsreaktionen von K48- (B) oder K63-verknüpften Ub<sub>2</sub>-Varianten (C) mit cCue1/Ubc7 wurden bei 20 °C verfolgt. Die Erweiterung von Ub<sub>2</sub> mit proximaler R42A-Substitution ergab keine Zunahme der Fluoreszenzanisotropie. (D) Die Geschwindigkeitskonstanten der Verlängerungsreaktionen von Ub<sub>2</sub> (Abbildung 2-21) und R42A-Varianten sind im Vergleich gezeigt. Trotz eines gleichbleibenden Fluoreszenzanisotropiesignals werden Verlängerungsprodukte von K48- (E) und K63-verknüpftem Ub<sub>2</sub> (F) mit proximaler R42A-Substitution nachgewiesen.

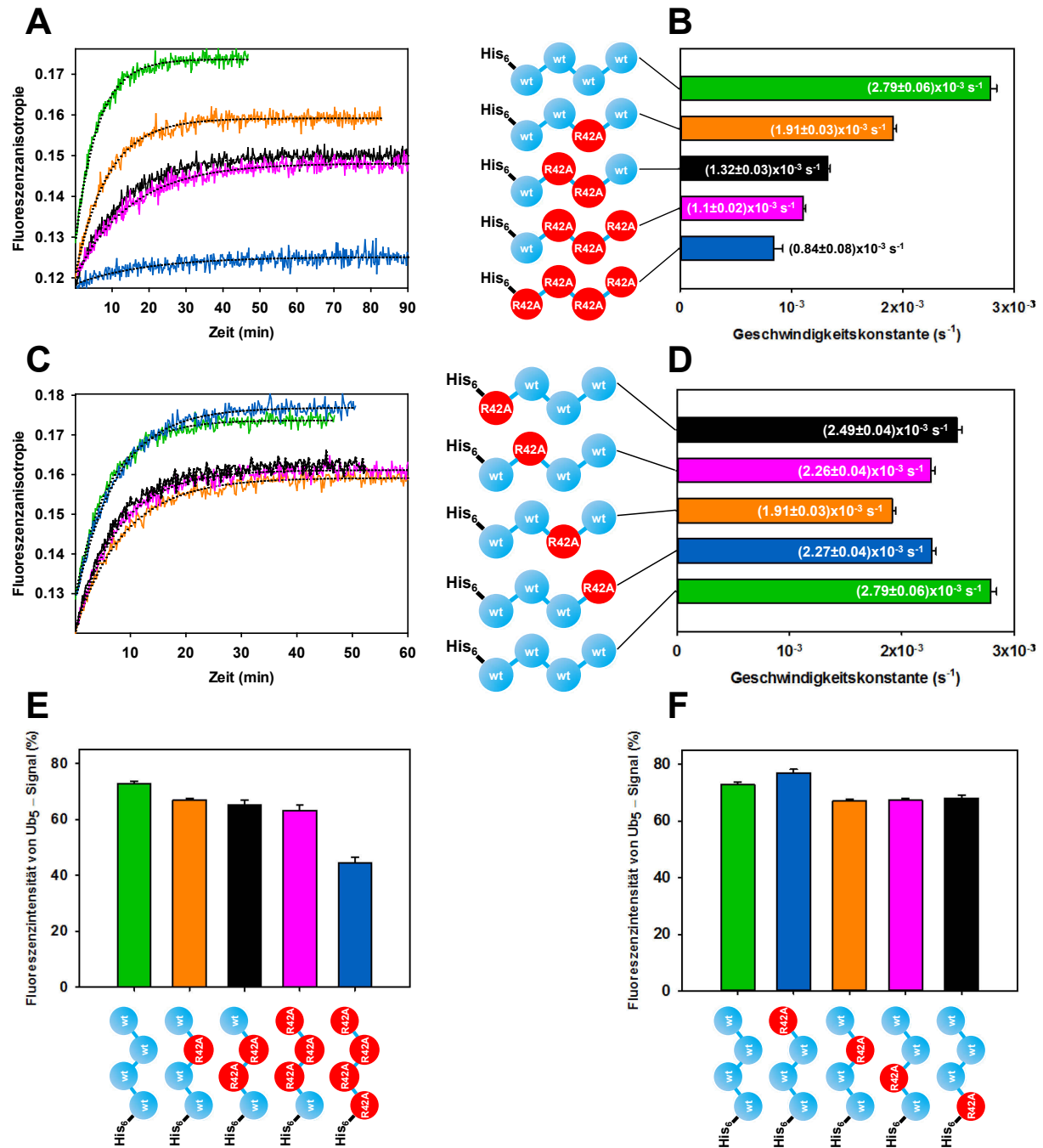


**Abbildung 2-28: Die Wechselwirkung von cCue1 (via der CUE-Domäne) mit der proximalen Ubiquitin-einheit von Diubiquitin stimuliert die Kettenverlängerung stärker als eine distale Bindung — Untersuchungen mittels kontinuierlicher Probenentnahme.** (A) Die Reaktionen in Abbildung 2-27 wurden zusätzlich mit cCue1 RGA und cHrd1 durchgeführt und die Verlängerungen von Diubiquitin anhand von kontinuierlich entnommenen Proben verfolgt. Die Kinetiken der Reaktionen mit cCue1 wt (—) und cCue1 RGA (—) sind ohne cHrd1 bei 20 °C in (B) und mit der RING-Domäne bei 10 °C in (C) dargestellt. (D) Die Kinetiken der Verlängerungsreaktionen von K48- (—) und K63-verknüpftem (—) Ub<sub>2</sub> und R42A-Varianten verdeutlichen einen stimulierenden Effekt der Wechselwirkung der CUE-Domäne mit dem proximalen Ubiquitinmolekül unabhängig von der Kettenverknüpfung.

---

### **2.1.8.9 Die Wechselwirkung von cCue1 mit der zum Akzeptorubiquitin benachbarten Ubiquitineinheit stimuliert die Kettenverlängerung**

Diubiquitin ist das einfachste Substrat für die Untersuchung der Kettenverlängerung durch E2-Enzyme. Das Dimer eignet sich aber nur bedingt für die Charakterisierung der CUE-Domäne, dessen stimulierender Einfluss mit steigender Kettenlänge zunimmt. Die Wirkungsweise von Cue1 kann am plausibelsten anhand von Verlängerungsreaktionen mit R42A-Varianten von K48-Tetraubiquitin beschrieben werden. Das Tetramer wird mit einer steigenden Anzahl an Ubiquitin-R42A zunehmend langsamer und ineffizienter von cCue1/Ubc7 verlängert (Abbildung 2-29 A, B und E). Anzunehmen ist, dass cCue1 über die CUE-Domäne an die einzelnen Monomere von Ub<sub>4</sub> bindet und das E2-Enzym an den Ubiquitinketten anreichert. Das Maß der Beschleunigung variiert, wie bereits für Diubiquitin gezeigt, abhängig von der Position der Bindung von cCue1 innerhalb der Kette. Verlängerungsexperimente mit Tetraubiquitin, das einzelne R42A-Varianten an unterschiedlichen Stellen der Kette aufweist, verdeutlichen, dass cCue1 die Kettenerweiterung positionsabhängig stimuliert (Abbildung 2-29 C, D und F). Am stärksten beeinträchtigt eine R42A-Substitution, die benachbart zu dem Akzeptorubiquitin platziert ist, die Reaktion. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Verlängerungsexperimenten von Diubiquitinvarianten im vorherigen Kapitel.

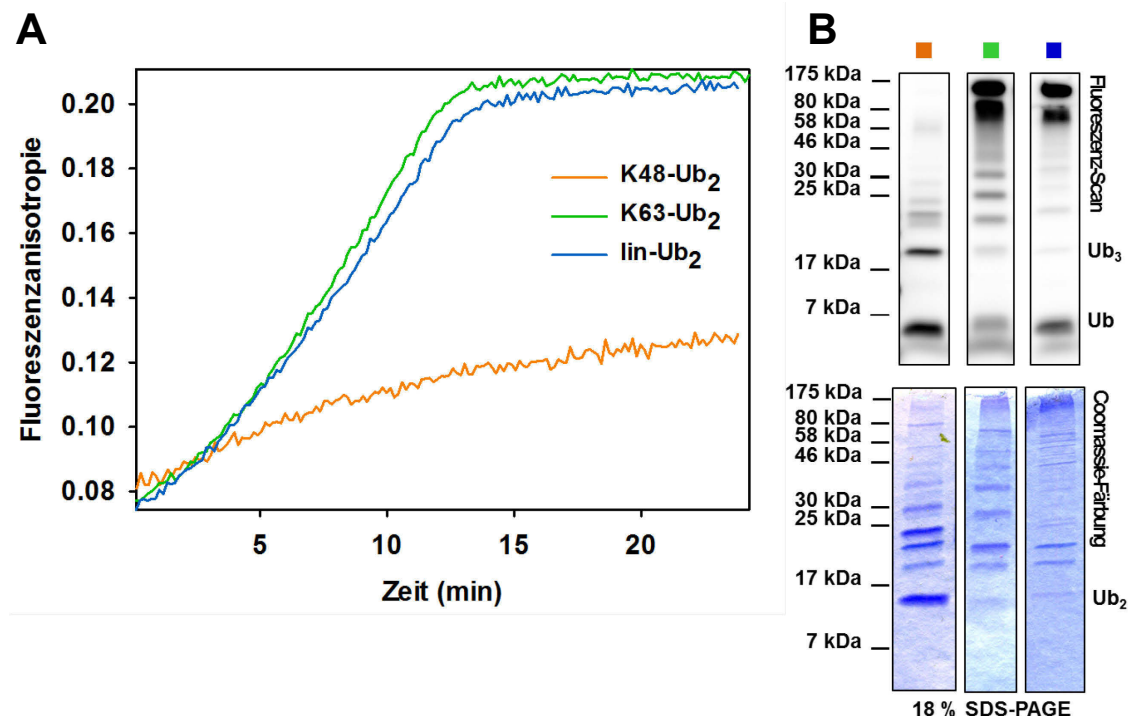


**Abbildung 2-29:** cCue1 bindet *via* der CUE-Domäne an einzelne Ubiquitineinheiten innerhalb einer Kette und stimuliert deren Verlängerung im unterschiedlichen Maße. Die Wechselwirkung mit dem Ubiquitinmolekül, das benachbart zu dem distalen Akzeptorubiquitin liegt, beschleunigt die Kettenverlängerung am stärksten. Gezeigt sind die Kinetiken (A, C), die Geschwindigkeitskonstanten (B, D) und die Ausbeuten an Pentaubiquitin (E, F) der Verlängerungsreaktionen von K48-Ub<sub>4</sub>-Varianten mit multiplen R42A-Substitutionen (A, B, E) oder mit einzelnen R42A-Ubiquitinvarianten (C, D, F). Die Reaktionen wurden mit cCue1/Ubc7 bei 20 °C durchgeführt.



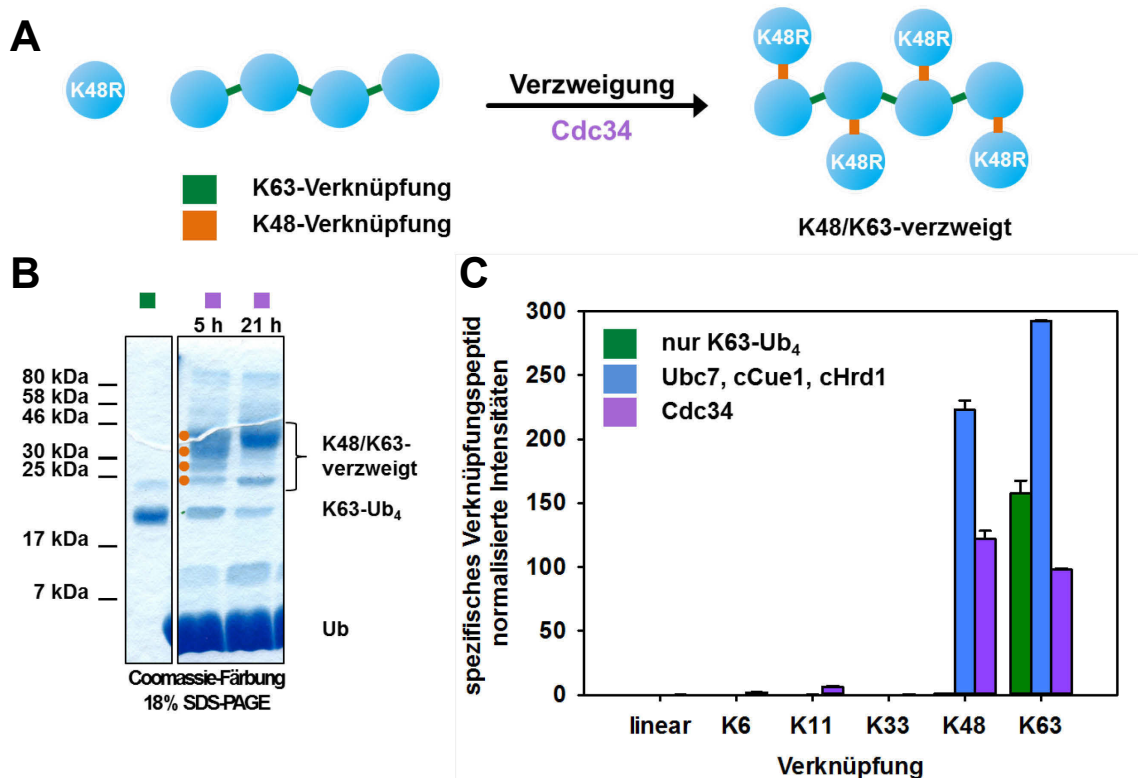
### 2.1.9 cCue1/Ubc7 verzweigt linear oder K63-verknüpfte Ketten *in vitro*

In den bisher aufgeführten Ubiquitinierungsreaktionen wurden K63- oder linear-verknüpfte Substratketten eingesetzt, die ausschließlich eine endständige Verlängerung zulassen. K48R-Aminosäureaustausche in den entsprechenden Ubiquitineinheiten verhindern eine Verzweigung der Oligomere. Eine Kettenverlängerung um eine Ubiquitineinheit wird stets von einer monoexponentiellen Kinetik beschrieben. Diese Beobachtung ist unabhängig von der Kettenlänge, der Verknüpfungsart oder der Position der zu verlängernden Einheit (Abbildung 2-20 und Abbildung 2-21). Im Gegensatz dazu beschreibt die Fluoreszenzanisotropie in Verzweigungsreaktionen mit K63- oder linear verknüpftem Diubiquitin, das zwei freie K48-Reste aufweist, einen sigmoiden Signalverlauf (Abbildung 2-30 A). Fluoreszenz-Scans in Abbildung 2-30 B veranschaulichen, dass während der Reaktionen hochmolekulare Ubiquitinkonjugate gebildet werden. Ansätze mit Ub<sub>4</sub> führen zu ähnlichen Beobachtungen (Daten nicht gezeigt). Massenspektrometrische Untersuchungen der Endprodukte bestätigen eine K48-Verzweigung der vorgefertigten K63-Ketten (Abbildung 2-31 C). cCue1/Ubc7 scheint mechanistisch in der Lage zu sein, eine K63- oder linear verknüpfte Kette mit K48-Polyubiquitin zu erweitern.



**Abbildung 2-30: Verlängerungsreaktionen von linear oder K63-verknüpftem Diubiquitin, das zwei freie K48-Reste aufweist, sind im Vergleich zu Ansätzen mit K48-Ub<sub>2</sub> stark beschleunigt und erzeugen hochmolekulare Ubiquitinkonjugate.** (A) Die Kinetiken der Verlängerung von Diubiquitinmolekülen mit linearer (—), K48- (—) oder K63-Verknüpfung (—) wurden in Anwesenheit von cCue1/Ubc7/cHrd1 bei 20 °C verfolgt. (B) Die Produkte wurden nach einer Reaktionsdauer von 25 min durch SDS-PAGE, Fluoreszenz-Scanning und Coomassie-Färbung überprüft.

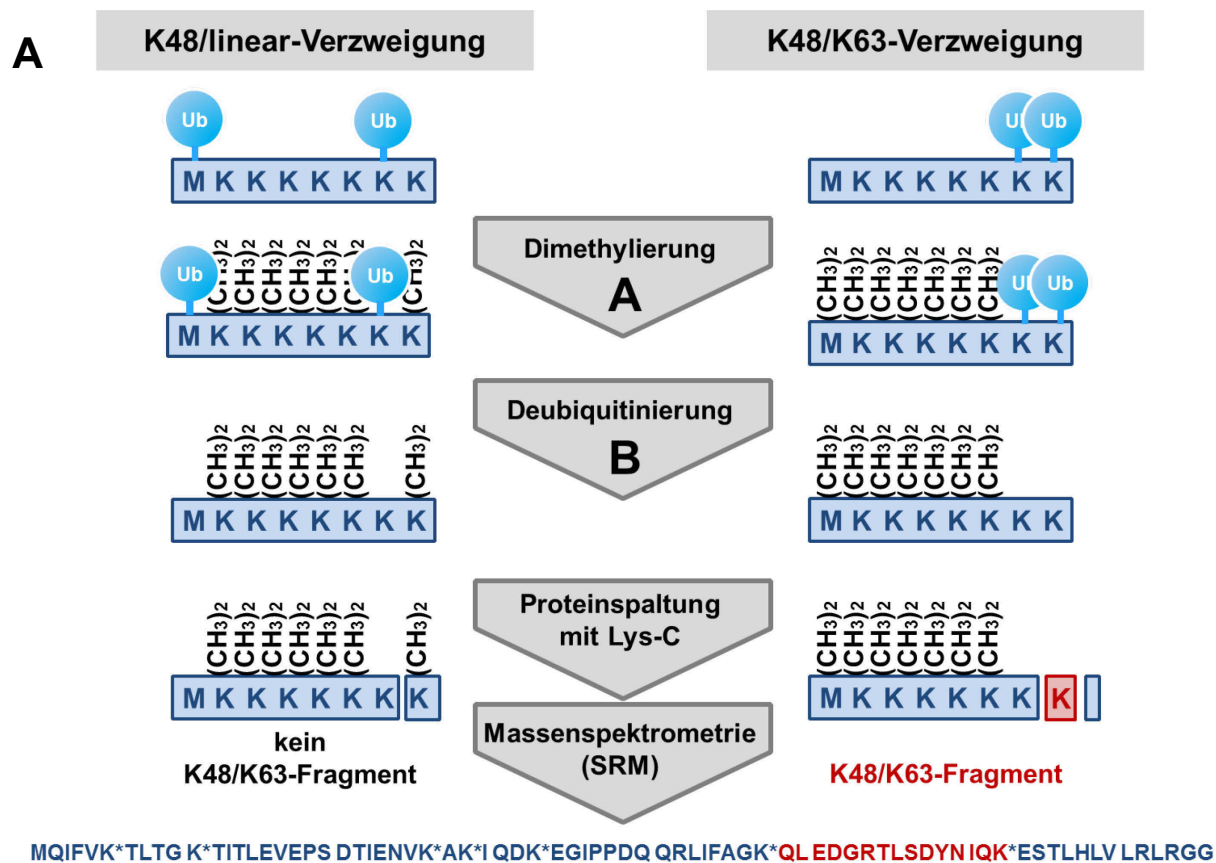
Außer cCue1/Ubc7 sind auch andere K48-abhängigen E2-Enzyme wie Cdc34 (Abbildung 2-31) und Ube2k (Daten nicht gezeigt) in der Lage K63-Ketten zu verzweigen. Für eine bessere Übersicht der gebildeten Verknüpfungsprodukte wurde die Ubiquitinvariante-K48R mit K63-Ub<sub>4</sub> und Cdc34 inkubiert. Proben, die zu unterschiedlichen Reaktionszeiten entnommen wurden, zeigen eine sukzessive Verzweigung des Tetraubiquitinmoleküls an seinen vier K48-Resten. Die entstandenen Ketten bestehen aus K63- und K48-verknüpften Ubiquitmolekülen (Abbildung 2-31 C) und dienen als Referenzmoleküle für den massenspektrometrischen Nachweis von K48/63-verzweigten Ubiquitinketten im folgenden Kapitel.



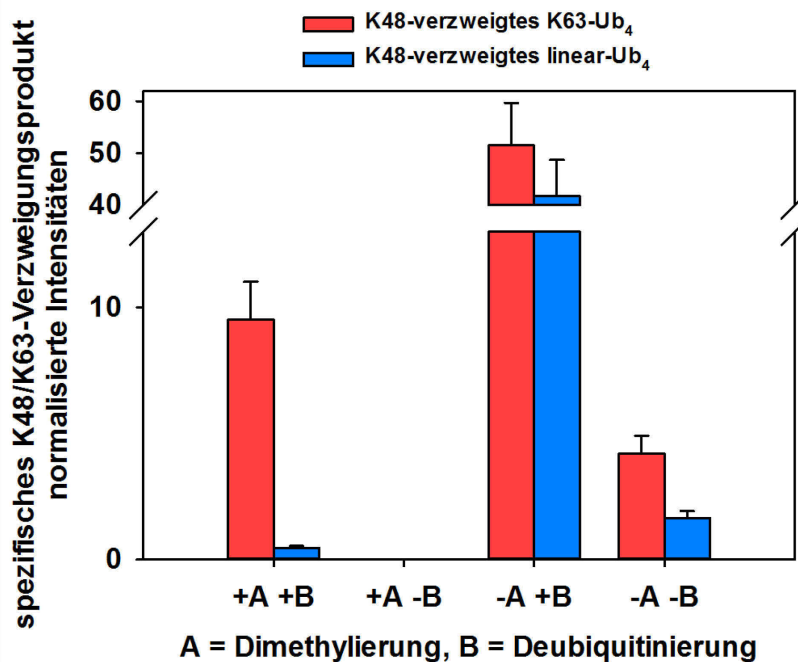
**Abbildung 2-31: Enzymatischer Aufbau von K48-verzweigten K63-Ketten *in vitro*.** (A) Experimentelle Konzeption einer K48/K63-Verzweigungsreaktion: Vorgefertigtes K63-verknüpftes Ub<sub>4</sub> wird an jedem freien K48-Rest mit einer Ubiquitinvariante-K48R durch ein K48-abhängiges E2 (Cdc34) bei 37 °C verzweigt. (B) Proben des K63-Ub<sub>4</sub> (■) und der Verzweigungsreaktionen mit Cdc34 (■) nach 5 und 21 h wurden durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft. K48R-Ubiquitinmoleküle werden sukzessive mit den vier freien K48-Resten des K63-Ub<sub>4</sub> verknüpft (●). (C) Die Verknüpfungsart der Ubiquitinmoleküle wurde für K63-Ub<sub>4</sub> (■) und die Verzweigungsreaktionen von K63-Ketten durch Cdc34 (■) oder durch cCue1/Ubc7/cHrd1 (Abbildung 2-30, ■) massenspektrometrisch bestimmt (*Selected Reaction Monitoring*).

### 2.1.10 Massenspektrometrischer Nachweis von K48/K63-verzweigten Ubiquitinketten

Im Falle einer biologischen Relevanz sollten K48/K63-verzweigte Ubiquitinketten in Zelllysaten nachweisbar sein. Zusammen mit der Arbeitsgruppe von Dr. Dittmar (MDC) wurde ein massenspektrometrischer Ansatz zur Detektion von Ketten dieser Verzweigungsart entwickelt. Bei einer K48/K63-Verzweigung sind die Verknüpfungspunkte des Akzeptor-ubiquitinmoleküls benachbarte Lysinreste. Diese Eigenschaft kann genutzt werden um ein Peptid zu generieren, das nur bei dieser Verzweigungsart entsteht. Die Endoproteinase Lys-C spaltet Peptidbindungen C-terminal von Lysin und zeigt keine Aktivität an modifizierten Aminosäuren. Eine Dimethylierung von Lysinresten, die nicht mit einem Ubiquitinmolekül verbunden sind, gewährleistet die spezifische Entstehung des Fragments. Da Lys-C keine Aktivität bei Lysinresten aufweist, die Ubiquitin über eine Isopeptidbindung gebunden haben, werden Ubiquitinketten nach dem Methylierungsschritt und vor der Lys-C Behandlung durch eine unspezifische Deubiquitinase (Usp2<sub>cat</sub>) vollständig abgebaut. Die gerichtete massenspektrometrische Methode *selected reaction monitoring* (SRM) wird verwendet, um das spezifische Peptid nachzuweisen und relativ zu quantifizieren. Der beschriebene Versuchsansatz wurde anhand *in vitro* assemblierter Ketten mit einer K48/K63- oder einer K48/linearen-Verzweigung überprüft. Abbildung 2-32 zeigt den Arbeitsablauf der Probenvorbereitung und die Messergebnisse der Ansätze mit den Referenzketten. Das spezifische Peptid konnte in Messungen von K48-verzweigtem K63-Ub<sub>4</sub> nachgewiesen werden, wurde aber nicht in Proben mit dem K48-verzweigtem linearem-Tetramer detektiert. Eine Probenvorbereitung ohne Deubiquitinierung erzeugt kein K48/63-Peptid, da die gebundenen Lysinreste nicht für eine Spaltung durch Lys-C freigelegt werden. Bei einem Kettenabbau ohne eine vorherige Methylierungsreaktion wird das Fragment in allen Ubiquitinmolekülen generiert. In Abwesenheit beider Behandlungsschritte entsteht das Peptid nur bei einem Teil der Ubiquitineinheiten.



**B**



**Abbildung 2-32: Massenspektrometrischer Nachweis von K48/63-verzweigten Ubiquitinketten.** Bei einer K48/K63-Verzweigung von Ubiquitinketten kann ein spezifisches Peptid erzeugt und mittels Massenspektrometrie detektiert werden. Die Schritte der Probenvorbereitung sind schematisch für ein K48/linear-verzweigtes (links) und ein K48/K63-verzweigtes Ubiquitinmolekül (rechts) dargestellt. Nach einer Methylierungsreaktion sind die  $\epsilon\text{NH}_2$ -Gruppen von ungebundenen Lysinresten dimethyliert und für eine spätere proteolytische Spaltung blockiert. Durch die Zugabe eines deubiquitinierenden Enzyms ( $\text{Usp2}_{\text{cat}}$ ) werden alle Ubiquitin-Ubiquitin-verknüpfungen gespalten. Dadurch werden verzweigte Lysinreste freigelegt und für Lys-C zugänglich. Die Endoproteinase spaltet Peptidbindungen C-terminal von Lysinresten und erzeugt bei K48/K63-verzweigten Ubiquitinketten ein spezifisches Fragment. (B) K48/K63-Peptide können durch die massenspektrometrische Methode *Selected Reaction Monitoring* (SRM) detektiert und dessen relative Mengen quantifiziert werden. K63- $\text{Ub}_4$  (■) und lineares- $\text{Ub}_4$  (■), das jeweils mit Ubiquitin-K48R gemäß Abbildung 2-31 verzweigt ist, dienen als Referenzketten, um die Entstehung des K48/K63-Peptids abhängig von einem Methylierungs- und Deubiquitinierungsschritt zu überprüfen. Erfolgen beide Reaktionen, wird das spezifische Fragment in Proben mit K48-verzweigten K63-Ketten, nicht aber mit K48-verzweigten linearen Ketten nachgewiesen.

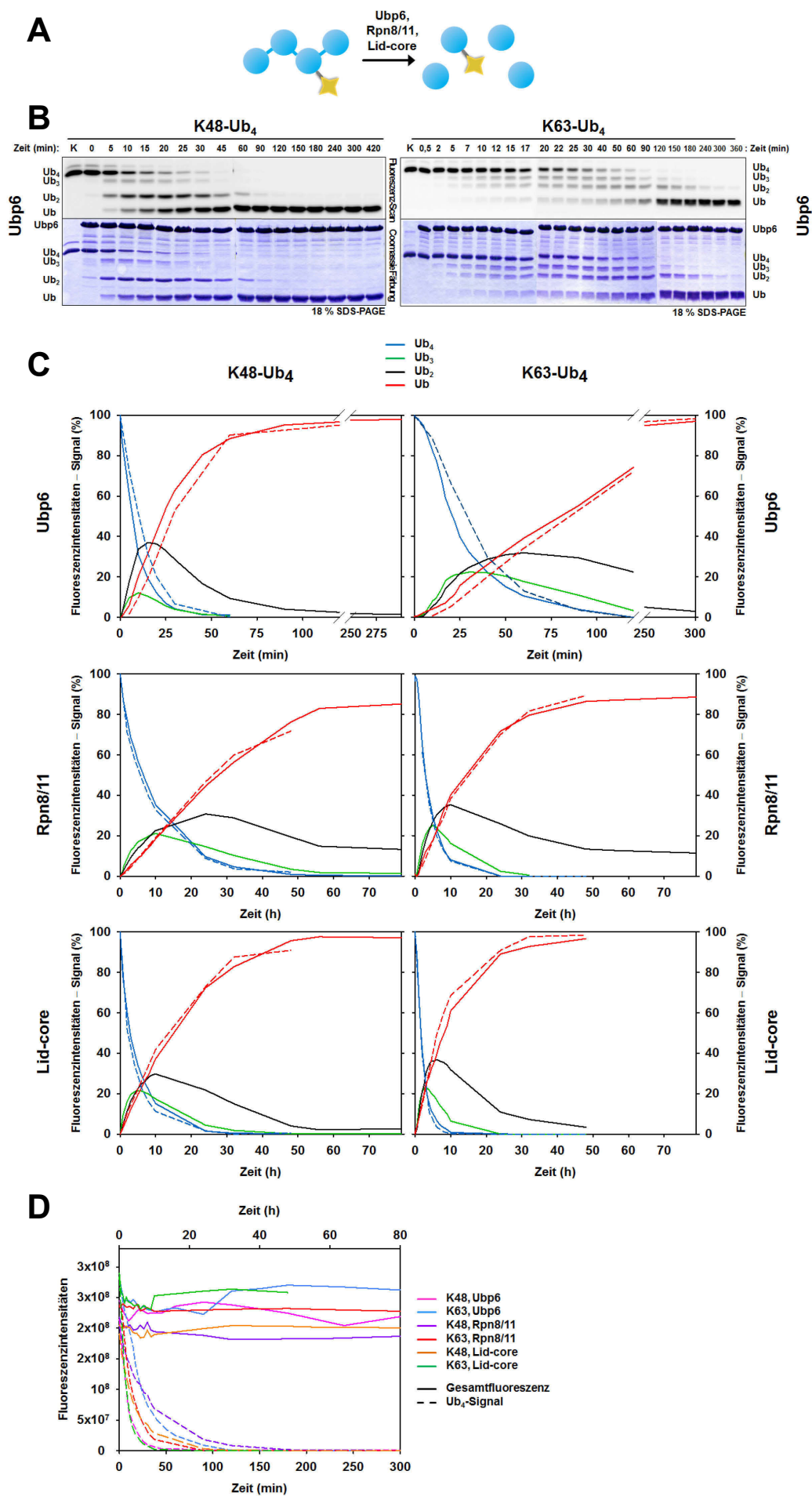
## 2.2 Fluoreszenz-basierte Untersuchungen von *in vitro* Deubiquitinierungsreaktionen

In Kapitel 2.1 wurden Fluoreszenz-basierte Methoden zur Untersuchung der Synthese von Ubiquitinketten vorgestellt. Am Beispiel der CUE-Domäne von Cuel wurde gezeigt, dass einzelne Komponenten der Ubiquitinierungsmaschinerie charakterisiert werden können. Fluoreszenzmessungen eignen sich ebenfalls für Analysen der Rückreaktion, der Deubiquitinierung. Kettenabbaureaktionen gestalten sich mit meist nur einem Enzym, einem DUB, einfacher als Untersuchungen einer ATP-abhängigen enzymatischen Kaskade. Wiederum können die Reaktionskinetiken anhand einer kontinuierlichen Probenentnahme oder mittels Fluoreszenzanisotropie verfolgt werden.

### 2.2.1 Die Aktivitäten von Ubp6, Rpn8/11 und Lid-core in Isolation

Am Proteasom modulieren sowohl Ubiquitinligasen als auch Deubiquitinasen Ubiquitinketten und regulieren somit die Effizienz der Proteolyse von Substratproteinen. Ubp6 und Rpn11 sind Proteasom-assoziierte DUBs, deren Aktivitäten in Isolation untersucht werden sollten. Dieses Teilprojekt wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Glickman (Technion, Haifa, Israel) durchgeführt. Die *in vitro* Reaktionen enthielten fluoreszenz-markierte Tetraubiquitinmoleküle als Substrat, die für einen Vergleich der Abbaukinetiken in gleichen Konzentrationen eingesetzt wurden. Der Kettenabbau wurde durch eine kontinuierliche Entnahme von Proben verfolgt, die anschließend mittels SDS-PAGE und Fluoreszenz-Scanning untersucht wurden (Abbildung 2-33 A und B). Die

Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Kettenspezies ( $Ub_4$ ,  $Ub_3$ ,  $Ub_2$ ) und von Monoubiquitin wurden quantifiziert und der zeitliche Verlauf der Signale in Abbildung 2-33 C zusammengefasst. Demnach katalysiert Ubp6 den Abbau von  $Ub_4$  am schnellsten und zeigt eine Präferenz für K48-Verknüpfungen. Während bei K63- $Ub_4$  die Zwischenprodukte  $Ub_3$  und  $Ub_2$  in ähnlichem Maße gebildet werden, führt die Reaktion mit K48- $Ub_4$  zu einer starken Anhäufung von  $Ub_2$ . Ubp6 scheint unterschiedlichen Abbaumechanismen zu folgen, die abhängig von der Verknüpfungsart der Ubiquitinkette sind. Rpn11 prozessiert  $Ub_4$  wesentlich langsamer als Ubp6 und zeigt, integriert in den Proteasomunterkomplex *Lid-core* (Rpn5, -6, -8, -9, und -11), eine höhere Aktivität als das Heterodimer Rpn8/11. Im Gegensatz zu Ubp6 baut Rpn11 K63- $Ub_4$  schneller ab als K48-Ketten. Die Zwischenprodukte  $Ub_2$  und  $Ub_3$  entstehen in vergleichbaren Mengen. Die Gesamtintensitäten der Fluoreszenz sind in allen entnommenen Proben über die Zeit vergleichbar (Abbildung 2-33 D).



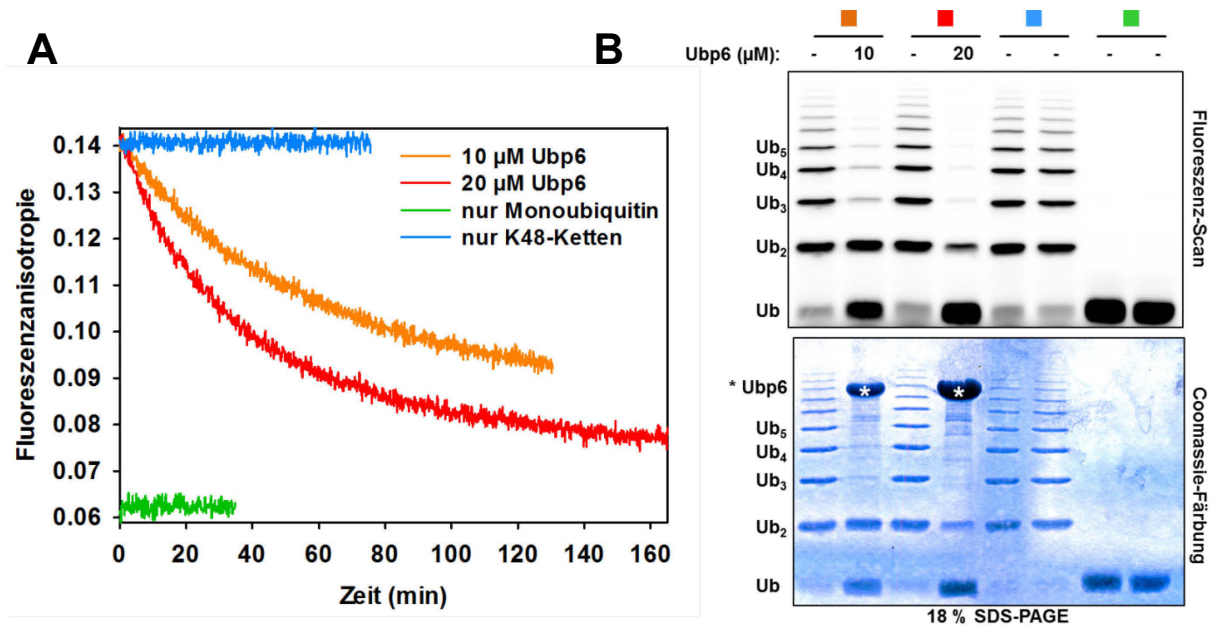


**Abbildung 2-33: Fluoreszenz-basierte Untersuchungen der deubiquitinierenden Enzyme des Proteasoms Ubp6 und Rpn11.** (A) *In vitro* werden gleiche Mengen von K48- oder K63-verknüpften Tetraubiquitinmolekülen durch Ubp6, Rpn8/11 oder *Lid-core* (Rpn5, -6, -8, -9, und -11) abgebaut. Die Substrate beinhalten 1 % fluoreszenzmarkierte Ubiquitineinheiten (Ub488), die statistisch verteilt in den Ketten vorliegen. Die Deubiquitinierung findet bei 30 °C statt und wird durch eine kontinuierliche Probenentnahme mit anschließender SDS-PAGE, Fluoreszenz-Scanning und Coomassie-Färbung verfolgt. (B) Exemplarisch sind die Rohdaten des Abbaus von K48- und K63-Ub<sub>4</sub> durch Ubp6 gezeigt. Anhand des Fluoreszenz-Scans können die Mengen von Tetraubiquitin und der Abbauprodukte bestimmt werden. In der Coomassie-Färbung wird das eingesetzte DUB sichtbar. (C) Der Abbau von K48- (links) und K63-verknüpftem Ub<sub>4</sub> (rechts) durch Ubp6, Rpn8/11 oder *Lid-core* ist im Vergleich dargestellt. Der Verlauf der Fluoreszenzsignale von Ub<sub>4</sub> (—), Ub<sub>3</sub> (—), Ub<sub>2</sub> (—) und Ub (—) ist gegen die Zeit aufgetragen. Zusätzlich sind Ub<sub>4</sub>- und Ub-Signale eines Wiederholungsexperimentes enthalten (--). (D) Die Gesamtintensität der Fluoreszenz (—) ist zu den jeweiligen Zeitpunkten den entsprechenden Ub<sub>4</sub>-Fluoreszenzintensitäten (--) gegenübergestellt und zeigt vergleichbare Werte.

### 2.2.2 Fluoreszenzanisotropiemessungen verfolgen den Abbau von Ubiquitinketten

Analysen von Deubiquitinierungsreaktionen mittels einer kontinuierlichen Probenentnahme sind experimentell aufwändig und benötigen große Mengen an Kettensubstrat und Enzym. Fluoreszenzanisotropiemessungen verfolgen den Kettenabbau in kleinen Volumina und liefern direkt die Reaktionskinetiken (Abbildung 2-34 A und Abbildung 2-35 C). In Ansätzen ohne DUB ist die gemessene Anisotropie unverändert. Nach Zugabe von Ubp6 sinkt das Signal bei einem vollständigen Abbau der Ubiquitinketten auf das Niveau einer Kontrollmessung mit Monoubiquitin. Die Abbaureaktion ist erwartungsgemäß schneller, je mehr DUB hinzugegeben wird. Neben einem Substratgemisch kann auch der Abbau einzelner Kettenspezies untersucht werden. Abbildung 2-35 zeigt exemplarisch Deubiquitinierungsreaktionen von K48-Ub<sub>2</sub> oder K48-Ub<sub>4</sub> mit Ubp6. Das DUB, welches in steigenden Konzentrationen eingesetzt wird, baut Diubiquitinmoleküle, die in gleichbleibenden Mengen enthalten sind, schneller und effizienter ab. Die Sättigung der Fluoreszenzanisotropie oberhalb des Signals der Kontrolle mit Monoubiquitin weist auf eine unvollständige Abbaureaktion bei geringen Ubp6-Konzentrationen hin. Entsprechend ist intaktes Ub<sub>2</sub>-Substrat in den Fluoreszenz-Scans zu erkennen (Abbildung 2-35 C). In Experimenten mit Ub<sub>4</sub> ist die Substratkonzentration konstant gehalten und Ubp6 wird in unterschiedlichen Mengen zugegeben. Erwartungsgemäß baut ein DUB, das in gleichbleibender Menge eingesetzt wird, Ketten in abnehmenden Konzentrationen schneller ab. Die Kinetiken beider Experimentierreihen folgen einer monoexponentiellen Funktion. Die Geschwindigkeitskonstanten der Abbaureaktionen veranschaulichen aufgetragen gegen die Enzym- oder Substratkonzentrationen einen klaren Zusammenhang zwischen der Dosis und der Wirkung des DUBs.



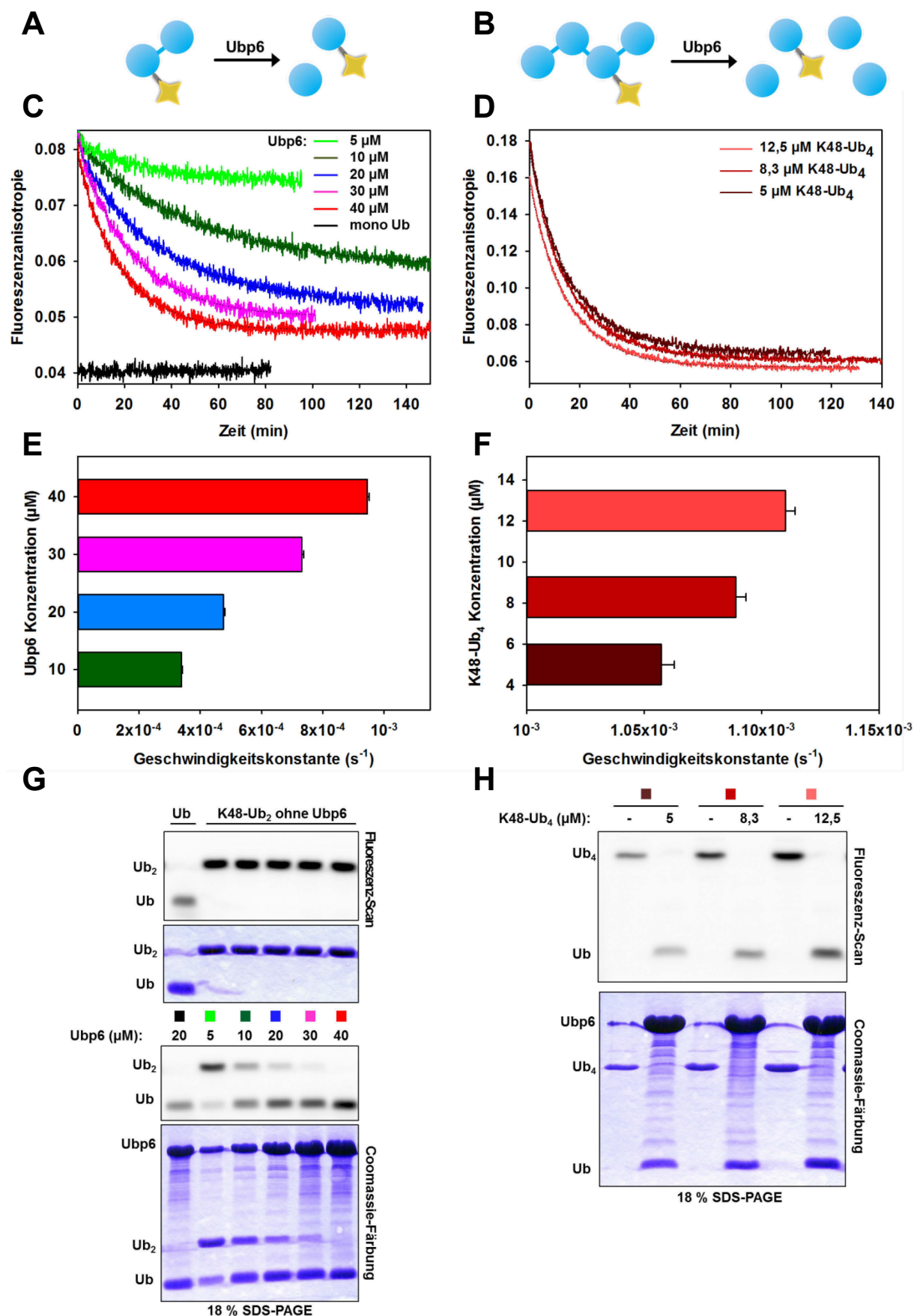


**Abbildung 2-34: Fluoreszenzanisotropiemessungen verfolgen den Abbau von Ubiquitinketten.** (A) Die Fluoreszenzanisotropie wurde während der Abbaureaktionen von fluoreszenzmarkierten, K48-verknüpften Ubiquitinketten ohne Ubp6 (—), mit 10  $\mu$ M (—) oder 20  $\mu$ M (—) Ubp6 bei 30 °C gemessen. Kontrollreaktionen mit Monoubiquitin (—, anteilig fluoreszenzmarkiert) ergeben Anisotropiewerte, die bei einem vollständigen Kettenabbau erreicht werden. (B) Der Abbau der Ubiquitinketten wurde durch eine Probenentnahme vor und nach Zugabe von Ubp6 (\*) mit anschließender SDS-PAGE, Fluoreszenz-Scanning und Coomassie-Färbung überprüft.

Die Abbildung befindet sich auf der folgenden Seite.

**Abbildung 2-35: Exemplarische Fluoreszenzanisotropiemessungen von Kettenabbaureaktionen mit Ubp6.**

Der Abbau von Diubiquitin (A) oder Tetraubiquitin (B) durch Ubp6 wurde mittels Fluoreszenzanisotropie bei 30 °C verfolgt. Ein Teil der Ubiquitineinheiten der verwendeten Ketten war fluoreszenzmarkiert. (links) 25  $\mu$ M K48-verknüpfte Diubiquitinmoleküle werden mit Ubp6 in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt (— 5  $\mu$ M, — 10  $\mu$ M, — 20  $\mu$ M, — 30  $\mu$ M, — 40  $\mu$ M, — ohne Ubp6). (rechts) Unterschiedliche Konzentrationen von Tetraubiquitin (— 5  $\mu$ M, — 8,3  $\mu$ M, — 12,5  $\mu$ M) werden mit 40  $\mu$ M Ubp6 inkubiert. Die Kinetiken (C, D) und die Geschwindigkeitskonstanten (E, F) der Kettenabbaureaktionen sind im Vergleich dargestellt. (G, H) Proben, die vor und nach der Zugabe von Ubp6 entnommen wurden, veranschaulichen in den Fluoreszenz-Scans und in den Coomassie-Färbungen die Effizienz der Reaktionen.



Die Abbildungsunterschrift befindet sich auf der vorherigen Seite.

### 3. Diskussion

Ubiquitin weist keine Enzymaktivität auf und moduliert eine Vielzahl verschiedener, zellulärer Signale [8]. Die posttranslationale Modifikation ist an den unterschiedlichsten biologischen Prozessen beteiligt [19], wie der zellulären Signalverarbeitung oder dem selektiven Abbau von Proteinen. Der Gebrauch von Ubiquitin als Proteinmarkierung evolvierte früh in Eukaryonten und ist in allen Tieren, Pflanzen und Pilzen beständig [123]. Aufgrund des hoch konservierten Grundprinzips der Markierungsreaktion eignet sich der praktikable und gut etablierte Modelorganismus Hefe, *Saccharomyces cerevisiae*, für Untersuchungen grundlegender Funktionen der Ubiquitinierungsmaschinerie [50]. Die Aufklärung molekularer Mechanismen gestaltet sich jedoch in Zellen aufgrund der hohen Komplexität und der geringen Proteinkonzentrationen meist als schwierig. Mithilfe von *in vitro* Experimenten, in denen gereinigte Komponenten des Ubiquitinsystems eingesetzt werden, können funktionelle Einheiten von ubiquitinabhängigen Prozessen zielgerichtet charakterisiert werden. Neben der spezifischen Erkennung von Substratproteinen oder der Regenerierung von Monoubiquitin durch Deubiquitinasen stellen Verknüpfungsreaktionen von Ubiquitineinheiten einen zentralen Schritt des Ubiquitinsignalwegs dar. Das Zusammenspiel von E1-, E2- und E3-Enzymen versieht Zielproteine mit der vielfältigen Modifikation und erzeugt sterisch unterscheidbare Signale, die von nachgeschalteten Effektorproteinen erkannt werden [124]. Ubiquitinsignale können monomer, multimer oder polymer aufgebaut sein. Entsprechend der Art der Ubiquitinmarkierung und der Substratklasse ist die Ubiquitinierungskaskade individuell zusammengestellt.

Jüngste Erkenntnisse weisen darauf hin, dass der Aufbau von Polyubiquitinsignalen in Verbindung mit einer ubiquitinbindenden Eigenschaft der E2-Enzyme steht [98,99,125,126]. Das Hefe E2 Ubc7 katalysiert zusammen mit seinem Kofaktor Cue1 eine K48-abhängige Polyubiquitinierung. Die CUE-Domäne von Cue1 ist eine ubiquitinbindende Domäne, die *in trans* die Synthese von Ubiquitinketten durch Ubc7 stimuliert. In dieser Arbeit konnte der beschleunigende Effekt der CUE-Domäne auf die Kettenbildung anhand von Fluoreszenzbasierten Methoden auf molekularer Ebene beschrieben werden. Fluoreszenzmessungen ermöglichen es, den Aufbau von Ubiquitinketten *in vitro* zu verfolgen und die Aktivitäten einzelner Komponenten der Ubiquitinierungskaskade zu beurteilen.

Ubiquitinsignale werden zunehmend als dynamische Markierungen eingeschätzt. Nach einer initialen Ubiquitinierung können die Signale durch weitere Ubiquitinligasen und Deubiquitinasen umgestaltet werden [127]. Für ein grundlegendes Verständnis der

Organisation von Ubiquitinsignalen ist die Untersuchung des Kettenaufbaus allein nicht ausreichend. Molekulare Kenntnisse über die Deubiquitinierung vervollständigen das Bild einer fein steuerbaren Regulation von Proteinen. Fluoreszenzmessungen, die auf fluoreszenzmarkierten Ubiquitinmolekülen beruhen, ermöglichen die Quantifizierung sowohl von Ubiquitinierungs- als auch von Deubiquitinierungsreaktionen.

#### 3.1 *In vitro* Ubiquitinierungsreaktionen mit cCue1 und Ubc7

*In vitro* können die einzelnen Komponenten der Ubiquitinierungskaskade molekular charakterisiert werden, da die rekonstituierten Reaktionen in messbaren Mengen und entsprechend der Fragestellung in unterschiedlicher Zusammensetzung durchgeführt werden können. Ubiquitinierungsreaktionen mit E1, Ubc7, cCue1 produzieren freie, ungebundene Ubiquitinketten [99]. Die RING-Domäne von Hrd1 beschleunigt die Bildung von Polyubiquitin, ist aber nicht entscheidend für die Aktivität des E2-Enzyms. Die Entstehung von freiem Polyubiquitin zeigt, dass Cue1/Ubc7 Ubiquitinmoleküle unabhängig von einem Substratprotein verknüpft. Die Synthese von ungebundenen Ubiquitinketten wird durch eine kettenverlängernde Eigenschaft des E2-Enzyms ermöglicht. Diese Funktion wird durch einen Vergleich von zwei *in vitro* Experimenten deutlich. Während cCue1/Ubc7 zwei Ubiquitinmonomere sehr langsam und ineffizient konjugiert, werden Ubiquitinketten durch das E2-System signifikant schneller verlängert. Die Verlängerung von Ketten wird durch die CUE-Domäne des E2-Kofaktors Cue1 stimuliert (2.1.8.4 und 2.1.8.5). Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die ubiquitinbindende Domäne als Substratrezeptor wirkt, der das E2-Enzym und die Substratkette in räumliche Nähe bringt. Cue1/Ubc7 scheint ein eigenständig funktionierendes System für den Aufbau von Ubiquitinpolymeren zu sein, das *in vivo* an unterschiedlichen E3-Ubiquitinligasen agiert [22,99,100]. Die wesentliche Aufgabe von Cue1/Ubc7 besteht vermutlich darin, Ubiquitinmarkierungen zu Polyubiquitinsignalen zu erweitern. Substratubiquitinierungen würden demnach einem zweistufigen Mechanismus folgen, wie bereits für den APC/C-Komplex beschrieben ([22], siehe auch 3.4). In einer ersten Reaktion würde das Substratprotein mit Ubiquitin gekennzeichnet, und das unvollständige Signal daraufhin durch eine Kettenverlängerung zu Polyubiquitin erweitert werden.

In der Zelle lokalisieren unter anderem Cue1 und Hrd1 die Ubiquitinierungsreaktion an die ER-Membran und verbinden die Substraterkennung im ER-Lumen mit der zytosolischen Ubiquitinierung [50]. Der Export von Substraten in das Zytosol verläuft über einen noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus [75,128,129]. Eine Ubiquitinierungsaktivität kommt

*in vitro* bereits durch die zytosolischen Fragmente der beiden membranständigen Proteine Cue1 (cCue1 mit U7BR und CUE-Domäne) und Hrd1 (cHrd1 mit RING-Domäne) zustande. Die räumliche Organisation an der ER-Membran scheint für einen Aufbau von Polyubiquitin nicht notwendig zu sein.

### 3.2 Fluoreszenz-basierte Untersuchungen von *in vitro* Ubiquitinierungsreaktionen

Die Detektion einzelner Proteine mittels Antikörper eignet sich besonders bei komplexen Proteingemischen wie Zelllysaten. Die bewährte Methode des *Western Blotting* liefert jedoch für Ubiquitinsignale lediglich qualitative Aussagen, da die in Länge und Verknüpfung abweichenden Strukturen unverhältnismäßig von Antikörpern gebunden und dargestellt werden. *In vitro* Ubiquitinierungsreaktionen bieten als offene Systeme die Möglichkeit fluoreszenzmarkierte Ubiquitinmoleküle einzusetzen. Die Fluoreszenzemission ist linear abhängig von der Konzentration des Farbstoffes und erlaubt eine Quantifizierung von Ubiquitinierungsreaktionen. Befinden sich allerdings zu viele Fluorophore in räumlicher Nähe, kann es zu Eigenfluoreszenzlöschungen kommen und der lineare Zusammenhang zwischen Signal und Konzentration ist nicht mehr gegeben [122]. Aus diesem Grund emittieren bei vollständiger Fluoreszenzmarkierung der beteiligten Ubiquitinmoleküle hochmolekulare Ketten vermutlich weniger Licht als Diubiquitinmoleküle oder ungebundene Ubiquitineinheiten (2.1.3.1).

Für eine Markierung mit Farbstoffen ist eine geeignete Position im Protein entscheidend. Der Markierungsort sollte lösungsmittel exponiert in einem Bereich des Proteins liegen, der nicht ausschlaggebend für dessen Funktion ist. In Bezug auf die Polymerisierung von Ubiquitin sind die verschiedenen Verknüpfungsstellen zu berücksichtigen, die 7 Lysine sowie der N- und C-Terminus. Ferner sind Oberflächenregionen von Ubiquitin, die an Wechselwirkungen mit Proteinen beteiligt sind, zu beachten (z.B. der Ubiquitinierungskaskade).

Abgrenzend zu anderen Proteinmarkierungen, wie beispielsweise mit Radionukliden, können Reaktionsverläufe direkt aufgezeichnet werden. Fluoreszenz-basierte Messungen sind präzise, sensitiv und können in Hochdurchsatzverfahren eingesetzt werden. Im Rahmen des Ubiquitin-Proteasom-Systems könnten Inhibitoren für krankheitsrelevante Ubiquitinligasen oder Deubiquitinasen identifiziert werden. Für eine eindeutige Zuordnung des Messsignals und der Reaktionsprodukte sollten weitere fluoreszierende Bestandteile in Fluoreszenzmessungen vermieden werden. Das ist besonders bei Untersuchungen von Komponentenbibliotheken von Bedeutung.

FRET-basierte Analysen von Ubiquitinierungsreaktionen beruhen auf einer Markierung von Ubiquitinmolekülen mit Donor- und Akzeptorfarbstoffen. In FRET-Messungen sollte die Signalveränderung ausschließlich auf eine Energieübertragung vom Donor- auf das Akzeptorfluorophor zurückzuführen sein. Während der Synthese von Ubiquitinketten scheint FRET aber nicht der einzige Grund für die Veränderung der Emissionen zu sein (2.1.3.2). Anscheinend beeinflusst die Beladung des E2-Enzyms Ubc7 das Signal.

Wesentlich weniger aufwändig gestalten sich Fluoreszenzanisotropiemessungen, die mit einem Bruchteil von einfach fluoreszenzmarkierten Ubiquitineinheiten durchgeführt werden. Der Anstieg der Fluoreszenzanisotropie in Verlängerungsreaktionen ist klar dem Größenzuwachs der Kette durch eine weitere Ubiquitineinheit zuzuordnen. Außerdem ist der Signalverlauf durch Zugabe einer Deubiquitinase reversibel. Der Abbau von Ubiquitinketten wird von sinkenden Anisotropiewerten begleitet (2.1.3.3 und 2.1.7). Weitere Kontrollexperimente beschreiben eine ATP-abhängige Reaktion, die lediglich bei einer Verlängerung von vorgefertigten Ketten zu einer Zunahme des Signals führt. Ein Vorteil der Markierung von Ubiquitineinheiten mit einem Farbstoff liegt in der Unterscheidung von Edukten und Reaktionsprodukten. Sobald fluoreszenzmarkierte Ubiquitinmonomere mit einem nicht-markierten Protein verknüpft werden, erscheint das Verknüpfungsprodukt im Fluoreszenz-Scan. Anhand von Proben, die nach der Sättigung des Fluoreszenzanisotropiesignals entnommen werden, können Aussagen über die Gleichgewichtseinstellungen der Reaktionen gemacht werden. Eine Analyse der Ubiquitinierung von unterschiedlichen Substratproteinen benötigt keine grundlegende Anpassung der Experimente. Im Gegensatz dazu, wäre bei FRET-basierten Untersuchungen eine Fluoreszenzmarkierung des jeweiligen Substrates notwendig.

Die *de novo* Synthese von Ubiquitinketten wird sowohl durch FRET- als auch durch Fluoreszenzanisotropiemessungen verfolgt (2.1.3.4). Die Signalverläufe korrelieren gut, doch die Zunahme der Anisotropie fällt im späten Bereich der Reaktionen geringer aus als der Anstieg der Akzeptoremission. FRET und Fluoreszenzanisotropie beruhen auf unterschiedlichen physikalischen Prinzipien, wodurch die verschiedenen Verknüpfungsreaktionen während der Kettenbildung das Messsignal vermutlich unterschiedlich stark beeinflussen. Die Kinetiken der *de novo* Synthese beschreiben eine sigmoide Funktion und spiegeln ein Reaktionsgemisch aus vielen, unterschiedlichen Verknüpfungsreaktionen von Ubiquitin wider. Detaillierte Aussagen über die beteiligten Enzyme können anhand dieser Experimente nicht getroffen werden. Mithilfe von *in vitro* Reaktionen, die eine Kettenverlängerung um ein Ubiquitinmolekül zulassen, können die einzelnen Konjugationsschritte getrennt untersucht werden

(2.1.4). Vorgefertigte Ubiquitinketten dienen dabei als Substrate und werden in mono-exponentiellen Reaktionen verlängert.

### 3.3 Die CUE-Domäne von Cue1 stimuliert die Polyubiquitinierung durch Ubc7

*In vitro* Ubiquitinierungen zeigen einen deutlich stimulierenden Einfluss der CUE-Domäne auf die Bildung von Polyubiquitin in der *de novo* Synthese (2.1.3.2 und 2.1.3.3) und auf die Verknüpfung einzelner Ubiquitinmoleküle in Kettenverlängerungsreaktionen (2.1.8). Die Bindung von Ubiquitineinheiten an Cue1 beschleunigt die Reaktionen und erhöht die Menge an konjugierten Ubiquitinmolekülen. Mithilfe von NMR-Titrationsexperimenten wurde für die CUE-Domäne von Cue1, ähnlich zu anderen CUE-Domänen [39,130], ein erweiterter Bindungsbereich um Ile44 von Ubiquitin festgestellt, der die Aminosäure R42 beinhaltet (Daten nicht gezeigt). Durch die Substitution-R42A kann die Bindung der CUE-Domäne an einzelne Monomere einer Ubiquitinkette geschwächt werden. Verlängerungsexperimente mit Ubiquitinketten, die sich in der Länge, der Verknüpfung und der inkorporierten Ubiquitineinheiten unterscheiden, erzielen bei gleichbleibenden Reaktionsbedingungen abweichende Geschwindigkeitskonstanten. Diese Beobachtungen sind abhängig von der Anwesenheit einer intakten CUE-Domäne und geben einen Hinweis auf eine spezialisierte Wirkungsweise der UBD während der Polyubiquitinierung (2.1.8.2 bis 2.1.8.5).

#### 3.3.1 Korrelation von Bindungsaffinität, Kettenverlängerung und Substratabbau

Einen klaren Zusammenhang zwischen der Eigenschaft und der Wirkung der CUE-Domäne vermitteln *in vitro* Ubiquitinierungen, die eine unterschiedlich starke Ubiquitinbindung der UBD untersuchen (2.1.8.1). Bindungsdefiziente cCue1- oder Ubiquitinvarianten führen zu einem langsameren und ineffizienteren Aufbau von Ubiquitinketten. Eine verzögerte und schwächere Polyubiquitinierungsaktivität verursacht *in vivo* einen langsameren und unvollständigen proteasomalen Abbau von Ubc6, das ein Substrat des Doa10-Ubiquitinligase-Komplexes ist. Wahrscheinlich ist eine starke anfängliche Ubiquitinierung von Ubc6 entscheidend für ein potentes Abbausignal. Zu kurze Ubiquitinketten können eventuell nur schlecht von dem nachgeschalteten Cdc48-Proteinkomplex erkannt werden. Als Folge würde das Substrat verzögert von der ER-Membran gelöst und verlangsamt zum Proteasom transportiert werden. Eine fehlende CUE-Domäne beeinträchtigt aber nicht den Abbau aller ERAD-Substrate. Besonders Membranproteine werden durch den Einfluss der CUE-Domäne schneller proteolysiert [99]. Müssen membranständige Substrate stärker ubiquitiniert werden

als lösliche Proteine, um effizient abgebaut zu werden? Oder sind zytosolische Substrate „einfacher“ zu ubiquitinieren, sodass der stimulierende Effekt der CUE-Domäne nicht benötigt wird? Diese Fragestellungen könnten anhand einer Analyse des Substratspektrums des E2-Enzyms in An- und Abwesenheit der UBD aufgegriffen werden. Bemerkenswert ist, dass die Verzögerung der Ubiquitinierung aufgrund der fehlenden CUE-Domäne nicht durch nachgeschaltete Ubiquitinligasen ausgeglichen wird. Beispielsweise sind an dem Cdc48-Komplex oder dem 19S-Partikel des Proteasoms weitere Ubiquitinligasen (und Deubiquitinasen) assoziiert [16,28,30,131], die Ubiquitinsignale prozessieren und eine schwächere Ubiquitinierung am HRD-Komplex kompensieren könnten. Ufd2 ist eine E4-Ubiquitinligase, die von Cdc48 rekrutiert wird und kurze Ubiquitinketten K48-abhängig verlängert [28,132,133]. Die Zielproteine dieses U-Box Proteins sind auf eine Teilmenge bekannter Doa10-Substrate begrenzt. Während E4-Enzyme Ubiquitinketten von vorab ubiquitinierten Molekülen erweitern, stimuliert die CUE-Domäne die Polyubiquitinierung direkt in Folge der Substraterkennung. Die Gestaltung von Ubiquitinsignalen an unterschiedlichen Positionen eines Signalweges lässt erahnen, wie dynamisch Ubiquitinmarkierungen organisiert sind. Je nach Substratklasse greifen vermutlich unterschiedliche Strategien des Aufbaus von Polyubiquitin. Durch die Aktivität von Cue1/Ubc7 werden Substrate dem proteasomalen Abbau zugeführt. Für Ziele wie Ubc6 findet anscheinend keine weitere Regulation über eine Veränderung des Ubiquitinsignals statt. Die grundlegende Entscheidung über das Schicksal des Proteins wird wahrscheinlich auf der Ebene der Substraterkennung und mit der Verknüpfung der ersten Ubiquitinmoleküle getroffen.

Die Entstehung einiger Ubiquitinsignale benötigt neben einer Polyubiquitinierungsaktivität einen gezielten Kettenabbau durch Deubiquitinasen, wodurch eine weitere Regulationsebene eröffnet wird. Ein Zusammenspiel von Ubiquitinierung und Deubiquitinierung wurde kürzlich bei der Bildung von K63-Polyubiquitin durch das E2/E3-System Rad6/Bre1 und der Deubiquitinase Ubp2 beobachtet [134]. Das regulative DUB wirkt einer konstitutiv aktiven Kettensynthese entgegen. Bei oxidativem Stress wird die Aktivität von Ubp2 inhibiert. Folglich werden Substratproteine vermehrt mit K63-Polyubiquitin modifiziert. Mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelte Zellen zeigen in Wachstumsexperimenten eine hohe Stressresistenz, die auf stabilisierte Ribo- und Polysomen sowie der Translation von Proteinen der Stressantwort zurückzuführen ist.



### 3.3.2 Die CUE-Domäne von Cue1 und gp78 im Vergleich

Die humane RING-E3-Ubiquitinligase gp78 ist vermutlich durch eine Fusion des Cue1- und Hrd1-Genes entstanden und enthält entsprechend eine Binderegion für das E2 Ube2g2 (in Hefe Ubc7), eine CUE- und eine RING-Domäne. Die Struktur und Funktion sind bis auf kleine Unterschiede ähnlich zu dem E2/E3-System in Hefe [99,135,136,137]. Die CUE-Domäne von Cue1 zeigt im Vergleich zu gp78 eine 10fach geringere Bindungsaffinität und eine gegensätzliche Präferenz für die Ubiquitinmoleküle von Diubiquitin [136]. Anstatt einer stärkeren Bindung der proximalen Einheit (Cue1-CUE, 2.1.8.7), wechselwirkt gp78-CUE favorisiert mit distalen Ubiquitinmolekülen. Diese Abweichungen entstanden vermutlich als Anpassung an den Wechsel von einer *in trans* zu *in cis* wirkenden CUE-Domäne.

### 3.3.3 Eine Erklärung für die Stimulation der Kettenverlängerung auf molekularer Ebene

In den durchgeführten Verlängerungsexperimenten von Ubiquitinketten wurden zwei grundlegende Beobachtungen gemacht, die Schlüsse auf die molekulare Wirkweise der CUE-Domäne zulassen. Zum einen beschleunigt anscheinend eine Zunahme potentieller CUE-Bindungsstellen innerhalb einer Ubiquitinkette deren Verlängerung. In Anwesenheit von cCue1 nimmt die Geschwindigkeit der Kettenverlängerung mit der Größe der Substrate zu (2.1.8.3, Abbildung 2-21). Reaktionen mit Tetraubiquitinvarianten, die eine steigende Anzahl an Monomere mit geschwächter CUE-Bindung (Ub R42A) beinhalten, werden langsamer (Abbildung 2-29 B). Die Wechselwirkung der UBD mit Ubiquitineinheiten erhöht vermutlich die lokale Konzentration von cCue1/Ubc7 an Ubiquitinpolymeren und macht eine Kettenverlängerung wahrscheinlicher. In Abwesenheit der UBD (cCue1 RGA/Ubc7) werden wachsende Ketten zunehmend langsamer verlängert (2.1.8.4 und diskutiert in 3.3.4). Anhand von Reaktionen mit und ohne CUE-Domäne lässt sich das Maß der Beschleunigung bestimmen. Bei K48-Verknüpfungen nimmt der stimulierende Effekt mit wachsender Kettenlänge zu. Dies gilt nicht für K63-verknüpfte Moleküle. Die Beschleunigung ist anscheinend abhängig von der Kettenverknüpfung und suggeriert ein abweichendes Bindungsverhalten der CUE-Domäne entsprechend des Kettentyps (3.3.4).

Kurz gefasst scheint die CUE-Domäne die Kettenverlängerung zu fördern und die erweiterte Kette steigert wiederum den stimulierenden Effekt der UBD. Dementsprechend können

Verlängerungsreaktionen von K48-Ketten in Anwesenheit der CUE-Domäne als selbstbeschleunigend angesehen werden.

Die zweite bedeutende Erkenntnis zeigt sich in Verlängerungsexperimenten mit Ketten, die einzelne Ubiquitinvarianten R42A an unterschiedlichen Positionen aufweisen. Durch eine schwächere Wechselwirkung der CUE-Domäne mit ausgewählten Kettenmonomeren, konnte ein eindeutiges Wirkungsprofil der CUE-Domäne erstellt werden. In Verlängerungsexperimenten mit einer Diubiquitinvariante, die eine proximale R42A-Substitution trägt, wird die Reaktion wesentlich stärker gehemmt als mit einer distal platzierten Variante (2.1.8.8). Durch die Bindung von Cue1 an die Einheit neben den Ubiquitinakzeptor werden Ubc7 und das Kettenende vermutlich am effektivsten für einen Transfer des E2-gebundenen Ubiquitinmoleküls ausgerichtet. Diese Beobachtung wurde für K48- oder K63-Ub<sub>2</sub> gemacht und verdeutlicht einen Positionierungseffekt unabhängig von der Verknüpfungsart.

Bei längeren Ketten scheint der Einfluss der CUE-Bindung nicht gleichbleibend für jedes weitere Monomer zu sein. Reaktionen mit Tetraubiquitin zeigen einen maximalen Effekt der Wechselwirkung mit der Ubiquitineinheit, die dem Akzeptorubiquitin benachbart ist (2.1.8.9). Die Stimulation durch Bindungsereignisse in Richtung des proximalen Kettenendes nimmt kontinuierlich ab. Trotz der kompakten Konformation von K48-Ketten weitet sich vermutlich der Abstand zwischen Cue1/Ubc7 und dem distalen Ende, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung von Ubiquitin verringert wird. Eine Interaktion der CUE-Domäne mit dem Akzeptorubiquitin stimuliert die Kettenverlängerung nur zu einem geringen Maße. Vermutlich wird das E2-Enzym an dieser Position nicht optimal ausgerichtet. Im Einklang mit dieser Überlegung werden Verlängerungsreaktionen mit Monoubiquitin durch die CUE-Domäne nicht beschleunigt (2.1.8.5). Es existiert keine proximale Ubiquitineinheit, die durch Bindung von Cue1 zu einer räumlichen Orientierung von Ubc7 führt. Neben der Beobachtung, dass Ubc7 Ubiquitinketten *in vitro* unabhängig von einem Substratprotein aufbaut, liefern diese Experimente einen weiteren Hinweis für ein eigenständiges Ubiquitinketten-verlängerndes E2-System an der ER-Membran.

Die CUE-Domäne von Cue1 scheint als Substratrezeptor zu wirken, der Ubiquitinketten nicht nur in die Nähe des E2-Enzyms bringt, sondern auch günstig für eine distale Verlängerungsreaktion präsentiert. Eine fehlende Rekrutierung der Ketten macht sich *in vitro* neben einer langsameren und ineffizienteren Verlängerung auch durch eine leicht unspezifische Ubiquitinierung bemerkbar. Im Vergleich zu Reaktionen mit cCue1 werden ohne die CUE-Domäne mehr hoch- und niedermolekulare Produkte gebildet (Abbildung 2-18 C). Fehlt die Ubiquitinbindung durch Cue1 befindet sich vermutlich weniger Ubc7 in direkter Umgebung von

Ubiquitinketten, wodurch die Wahrscheinlichkeit von Verknüpfungsreaktionen mit anderen Molekülen steigt.

### 3.3.4 Die Cue1-CUE-Domäne bindet präferentiell K48-verknüpfte Ubiquitinmoleküle

Nicht allein unterschiedliche Kettenlängen sondern auch verschiedenartig verknüpfte Ketten führen zu abweichenden Kinetiken der Verlängerungsreaktionen. Ubc7 katalysiert die Verbindung von Ubiquitinmolekülen über K48 und verlängert Ketten dieses Verknüpfungstyps am schnellsten, gefolgt von K63- und linearen Oligomeren (2.1.8.2). Vermutlich liegt der Grund für die unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten in den verschiedenen Konformationen der Ubiquitinpolymere. K48-Ketten grenzen sich mit einer kompakten Topologie deutlich von K63- und linear verknüpftem Polyubiquitin ab [44]. Die flexible Struktur linearer Ketten scheint für eine Verlängerung durch cCue1/Ubc7 am ungünstigsten zu sein. Tetraubiquitinmoleküle dieses Verknüpfungstyps werden sowohl am distalen als auch am proximalen Monomer am langsamsten erweitert. Im Gegensatz dazu wird die Direktionalität von Ubiquitinketten in Experimenten mit K63-Ketten deutlich. Die Verlängerung des distalen Ubiquitinmoleküls verläuft schneller als die proximale Konjugation. Offenbar werden kleine topologische Unterschiede der als äquivalent angesehenen Konformationen der K63- und linearen Ketten [44] von cCue1/Ubc7/cHrd1 erkannt. Der Vergleich von Reaktionen mit K48- oder K63-Ketten in An- oder Abwesenheit der CUE-Domäne zeigt eindeutig den Einfluss der Kettenkonformation auf die Verlängerungsreaktion. Ohne eine Ubiquitinbindung wird K48-Ub<sub>4</sub> wesentlich langsamer verlängert als K63-Ketten. Die Bindungsoberfläche um Ile44 von Ubiquitin ist vermutlich aufgrund der kompakten Topologie bei K48-Verknüpfung verdeckt. Ist die CUE-Domäne funktionell, ergeben sich umgekehrte Beobachtungen und Reaktionen mit K48-Ketten sind schneller. Die Konformationen von Ubiquitinpolymeren sind unter physiologischen Bedingungen nicht starr, sondern oszillieren zwischen gepackter und offener Form [42,43]. Vermutlich wird die Ile44-Bindungsstelle durch die Dynamik der Ketten zugänglich für Bindungsereignisse mit UBDs. Die CUE-Domäne von Cue1 scheint als Substratrezeptor eine schnelle Verlängerung von kompakten und schwer zugänglichen K48-Ketten zu gewährleisten.

In Interaktionsstudien mit dem CUE-Domänenpeptid und Tetraubiquitinmolekülen können leichte Unterschiede in der Stärke der Wechselwirkung abhängig von der Verknüpfungsart festgestellt werden. Die Kinetiken der Verlängerungsreaktionen der Ketten zeigen erwartungsgemäß eine Beschleunigung mit steigender Bindungsaffinität der UBD (Abbildung 2-21 B).

K48-verknüpftes Ub<sub>4</sub> wird am stärksten gebunden und am schnellsten verlängert. NMR-basierte Titrationsexperimente mit dem CUE-Domänenfragment und Diubiquitinmolekülen, deren distale oder proximale Einheiten <sup>15</sup>N-markiert sind, weisen auf eine Bindungspräferenz innerhalb von Ubiquitinketten hin. Die CUE-Domäne wechselwirkt zweifach stärker mit K48-verknüpften, proximalen Ubiquitinmolekülen als mit distalen Einheiten. Dagegen sind die Affinitäten für beide Positionen bei einer Verknüpfung über K63 ähnlich. Abhängig von der Verknüpfung scheint die CUE-Domäne leicht abweichenden Bindungsmodi zu folgen. Zusätzliche CSPs in den Untersuchungen der Wechselwirkung mit der proximalen Einheit von K48-Ub<sub>2</sub> lassen eine vergrößerte Bindungsoberfläche vermuten, die weitere Interaktionen mit dem C-Terminus des distalen Ubiquitinmoleküls aufweist (Daten nicht gezeigt).

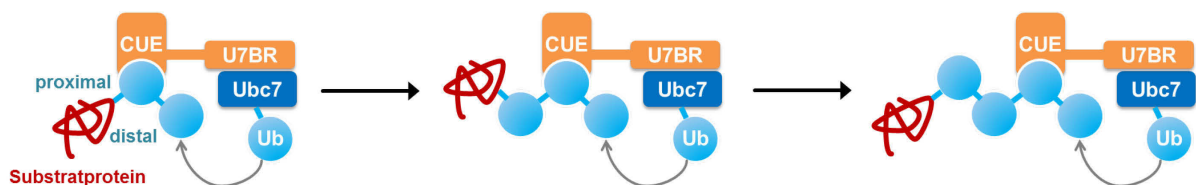
Unabhängig von der Verknüpfungsart erhöht sich an wachsenden Ubiquitinketten die Anzahl der CUE-Bindungsstellen und somit die lokale Konzentration von cCue1/Ubc7. K48-Ketten weisen zusätzlich affinere Wechselwirkungen auf, die eine zusätzliche Beschleunigung bewirken. Diese Präferenz für K48-verknüpfte Ubiquitinmoleküle unterstützt die Verlängerung von Ketten durch einen gesteigerten Positionierungseffekt. Wie bereits diskutiert, stimuliert eine Wechselwirkung der CUE-Domäne mit dem Monomer benachbart zu dem Akzeptorubiquitin die Kettenverlängerung am stärksten (3.3.3). Eine affinere Bindung an diese Ubiquitineinheit führt zu einer höheren Wahrscheinlichkeit einer effektiven Positionierung des E2-Enzyms. Zudem verbessert vielleicht eine schwächere Wechselwirkung mit dem distalen Monomer die Zugänglichkeit des Akzeptors für eine Ubiquitinübertragung durch Ubc7.

#### **3.3.5 Ein Model, das die CUE-Domänen assistierte Kettenverlängerung beschreibt**

Beruhend auf den vorgestellten Ergebnissen kann die Stimulation der Polyubiquitinierung durch die CUE-Domäne von Cue1 auf molekularer Ebene beschrieben werden. In einem ersten Schritt werden Proteine, die für den proteasomalen Abbau ausgewählt wurden, ubiquitiniert. Das Ubiquitinsignal ist unvollständig und wird daraufhin durch das E2-System Cue1/Ubc7 zu Polyubiquitin erweitert. Die ubiquitinbindende CUE-Domäne schützt vermutlich die Ubiquitinmarkierung vor einem Abbau durch Deubiquitinasen und stimuliert gleichzeitig die Verlängerung von Ubiquitinketten [99]. Wahrscheinlich erhöht die UBD die lokale Konzentration von Cue1/Ubc7 an der Ubiquitinkette und orientiert das E2-Enzym und das distale Kettenende günstig für eine Verlängerungsreaktion. Eine stärkere Wechselwirkung mit K48-verknüpften Ubiquitineinheiten steigert diesen Positionierungseffekt. Die schwache

Bindung der CUE-Domäne an einzelne Monomere gewährleistet eine dynamische Ausrichtung von Cue1/Ubc7 mit einer wachsenden Ubiquitinkette. Die CUE-Domäne von Cue1 wirkt als Substratrezeptor der abnehmenden Aktivität von Ubc7 bei steigender Kettenlänge entgegen und sichert einen schnellen und effizienten Aufbau von K48-Polyubiquitin. Durch seine ubiquitinbindende Eigenschaft wird Cue1 zu einem Beschleunigungsfaktor der Kettenverlängerung.

In den letzten Jahren wurde vermehrt ein Bezug zwischen Polyubiquitinierungsreaktionen und einer Bindung von Ubiquitin hergestellt. Die E2-Enzyme Ubc13 [125], Ube2g1 [126] und Cdc34 [98] tragen UBDs, die maßgeblich an dem Aufbau von polymeren Ubiquitinsignalen beteiligt sind. Für den E3-Komplex APC/C wurde ein Mechanismus der Kettensynthese beschrieben, der eine Stabilisierung des distalen Kettenendes durch die RING-Domäne vorsieht [138]. Das E2-System Cue1/Ubc7 stimuliert die Kettenverlängerung durch Wechselwirkungen der CUE-Domäne mit Ubiquitineinheiten, die benachbart zu dem Akzeptor liegen. Unser Model präsentiert einen neuen Mechanismus, wie die Synthese von Ubiquitinpolymeren auf molekularer Ebene organisiert wird und demonstriert die Bedeutung von ubiquitinbindenden Domänen während der Polyubiquitinierung. Es bleibt abzuwarten, ob weitere Mechanismen existieren, die vielleicht den Aufbau von komplexeren, heterogen verknüpften Ubiquitinketten ermöglichen.



**Abbildung 3-1: Die Funktion der ubiquitinbindenden CUE-Domäne von Cue1 bei der Synthese von Ubiquitinketten.** Durch die Bindung von Ubiquitin erhöht die Cue1-CUE-Domäne vermutlich die lokale Konzentration von Ubc7 an Ubiquitinketten und positioniert das E2-Enzym günstig für eine Verlängerungsreaktion. Wechselwirkt die UBD mit der Ubiquitineinheit benachbart zu dem Akzeptorubiquitin, wird die Kettenverlängerung am stärksten stimuliert. Die geringe Bindungsaffinität ermöglicht anscheinend einen dynamischen Wechsel der Ubiquitineinheiten und richtet das E2-Enzym kontinuierlich zu der wachsenden Kette aus. Die CUE-Domäne interagiert präferentiell mit K48-verknüpften Ubiquitinmolekülen und beschleunigt den Aufbau von Ketten dieses Verknüpfungstyps. Wahrscheinlich dient die CUE-Domäne dem Ubc7 als Substratrezeptor und garantiert eine schnelle und effiziente Polyubiquitinierung. Die CUE-Domäne macht Cue1 zu einem Beschleunigungsfaktor der Kettenverlängerung.

### **3.4 Die RING-Domäne von Hrd1 unterstützt die Bildung von Ubiquitinketten durch Ubc7**

Der unterstützende Effekt von Hrd1 auf die Polyubiquitinierung wurde ebenfalls in dieser Arbeit untersucht (2.1.8.6), wenn auch in einem geringeren Umfang als dies für den Einfluss der CUE-Domäne der Fall war. Einige Beobachtungen lassen einen interessanten Zusammenhang beider stimulierenden Domänen während des Kettenaufbaus vermuten. *In vitro* beschleunigt die RING-Domäne den Aufbau von Polyubiquitin (2.1.3.2 und 2.1.3.3) und die Verlängerung von Ubiquitinketten (Abbildung 2-24). Reaktionen mit Cue1 erzielen unabhängig von der Konzentration der RING-Domäne gleichbleibende Mengen an verlängerten Ketten. Ohne die CUE-Domäne und ohne cHrd1 sind die Reaktionen sehr ineffizient, können aber durch Zugabe von cHrd1 angeregt werden. Steigende Konzentrationen der RING-Domäne scheinen eine geringere Ausbeute bei fehlender CUE-Domäne zu kompensieren. Die Produktbildung ist durch die CUE-Domäne bereits maximal stimuliert, während die Reaktionsgeschwindigkeit durch die RING-Domäne noch erhöht werden kann.

Die Verknüpfungsart der Ketten scheint den Effekt von cHrd1 nicht zu beeinflussen (Abbildung 2-25) und ist damit zu erklären, dass RING-Domänen die Dissoziation des E2-gebundenen Ubiquitinmoleküls fördern [24]. Die stimulierende Wirkung von cHrd1 nimmt mit steigender Länge von K48- und K63-Ketten in ähnlichem Maße ab (Abbildung 2-25). Die CUE-Domäne hingegen beschleunigt Verlängerungsreaktionen von K48-Ketten mit wachsender Größe (Abbildung 2-22). Wahrscheinlich ergänzen sich die Effekte beider Domänen und gewährleisten dadurch einen schnellen und prozessiven Aufbau von Ubiquitinketten. Während die RING-Domäne von Hrd1 besonders die Verlängerung von kurzen Ketten beschleunigt, steigt die Wirkung der CUE-Domäne mit zunehmender Kettenlänge. Das Maß der Beschleunigung durch die CUE-Domäne fällt in Anwesenheit der Hrd1-RING-Domäne geringer aus, ist jedoch mit einer fünffach schnelleren Verlängerung von Diubiquitin immer noch signifikant (Abbildung 2-23). Der Einfluss von cHrd1 maskiert vermutlich die Stimulation durch die CUE-Domäne, woraufhin der Beschleunigungsfaktor in Anwesenheit der RING-Domäne geringer ausfällt. Sämtliche Schlussfolgerungen beruhen auf *in vitro* Experimenten mit den zytosolischen Domänen beider membranständigen Proteinen. Die räumliche Organisation von Cue1, Ubc7 und Hrd1-RING an der ER-Membran wird nicht berücksichtigt.

Eine mögliche Beschleunigung der Verlängerung von kurzen Ketten durch RING-Domänen lässt sich für beide ERAD-Ubiquitinligasen, Hrd1 und Doa10, unterschiedlich erklären.

Ubc7 agiert anscheinend als einziges E2-Enzym am HRD-Komplex. Die RING-Domäne kompensiert hier vermutlich die geringe Aktivität von Cue1/Ubc7 bei Monoubiquitin und kurzen Ketten, um eine kontinuierliche Kettensynthese zu gewährleisten. Für den APC/C-Ubiquitinligasekomplex wurde ein zweistufiger Mechanismus der Ubiquitinierung beschrieben, indem das E2 Ubc4 vorab das Zielprotein monoubiquitiniert und Ubc1 anschließend Ubiquitinketten aufbaut [95]. Bei einer sequentiellen Ubiquitinierung von ERAD-Substraten an der Doa10-Ubiquitinligase würde Ubc7 als kettenverlängerndes E2-Enzym fungieren. Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass Ubc6 den ersten Ubiquitinierungsschritt von Doa10-Substraten katalysiert. Es ist anzunehmen, dass die Monoubiquitinierung und die darauf folgende Kettenverlängerung rasch ablaufen. Geschwindigkeitsbestimmend ist vermutlich der Wechsel der E2-Enzyme an dem naszierenden Polymer. Ubc6 löst sich von dem Komplex und Cue1/Ubc7 assoziiert. Diese Verzögerung der Ubiquitinierung wird möglicherweise durch die stimulierende RING-Domäne kompensiert, um schnell ein effizientes Abbausignal zu erzeugen. Genauere Aussagen über die Wirkweise von RING-Domänen erfordern weiterer Untersuchungen.

### 3.5 Verzweigung von Ubiquitinketten und Ketten-Ketten-Verknüpfung

Der HRD-Komplex markiert Substratproteine für den proteasomalen Abbau mit einem spezifischen Polyubiquitinsignal. Ubc7 ist das involvierte E2-Enzym, das die Verknüpfung über K48 des Ubiquitinakzeptors katalysiert und homotypische Ketten aufbaut. Vor diesem Hintergrund erscheinen übermäßig schnelle Kinetiken von Verlängerungsreaktionen mit cCue1/Ubc7 und linearen oder K63-Ketten (keine K48R-Varianten) ungewöhnlich (Abbildung 2-30). Der Verlauf der Kinetiken verändert sich von monoexponentiell bei K48-Ub<sub>2</sub> zu sigmoid bei linearem oder K63-Ub<sub>2</sub>. Darüber hinaus werden hochmolekulare Ubiquitinkonjugate anstatt der erwarteten Tetraubiquitinmoleküle gebildet. Die starke Zunahme der Aktivität des E2-Enzyms und der Komplexität der Reaktion sind bei lediglich einem zusätzlich verfügbaren K48 überraschend. Anscheinend sind Ketten mit mehrfachen Verknüpfungsstellen günstige Substrate für Kettenverlängerungen und führen zu kooperativen Ubiquitinierungsreaktionen. Massenspektrometrische Untersuchungen bestätigen eine K48-Verzweigung der vorgelegten linearen oder K63-Ketten (Abbildung 2-31). Diese Beobachtungen wurden auch für längere Ubiquitinketten und für andere K48-abhängige E2-Enzyme gemacht und zeigen, dass E2-Enzyme mechanistisch in der Lage sind, andersartig verknüpfte Ubiquitinketten mit Polyubiquitin der „eigenen“ Verknüpfung zu dekorieren. Im

Vergleich zu homotypischen Ketten verfügen verzweigte Ubiquitinsignale über ein Vielfaches an spezifischen Bindungsstellen und können vermutlich besser von nachgeschalteten Proteinen erkannt werden. K48-Verzweigungen würden somit ein starkes Abbausignal darstellen. In diesem Zusammenhang wurde für ein K11/K48-verzweigtes Polyubiquitin-signal, das durch APC/C synthetisiert wird, eine gesteigerte Proteolyse von Regulatoren des Zellzyklus festgestellt [36]. Andererseits wurden auch heterotypisch verzweigte Ketten identifiziert, die den Abbau von Substratproteinen durch das Proteasom verlangsamen [139]. Alternativ könnten Ubiquitinsignale durch eine Kettenverzweigung „umgeschrieben“ werden und somit abweichende zelluläre Antworten hervorrufen. Das E2 Ubc1 verfügt über zwei Eigenschaften, die eine Funktion als Modulator von Ubiquitinsignalen befürworten. Unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass das K48-abhängige Enzym eine UBA-Domäne trägt, die präferentiell K63-Ketten bindet. Ubc1 könnte folglich das K63-vermittelte Schicksal eines Substrates in Richtung eines proteasomalen Abbaus „umprogrammieren“. Für Ubc7 existieren keine Hinweise auf eine Funktion als Kettenmodulator. Das E2-Enzym wird an der ER-Membran durch Cue1 aktiviert und ist vermutlich eingebettet in die Ubiquitinligase-Komplexen gut abgeschirmt. Wahrscheinlich sind ERAD-Substrate die einzigen Proteine, die das E2-System für eine Polyubiquitinierung präsentiert bekommt.

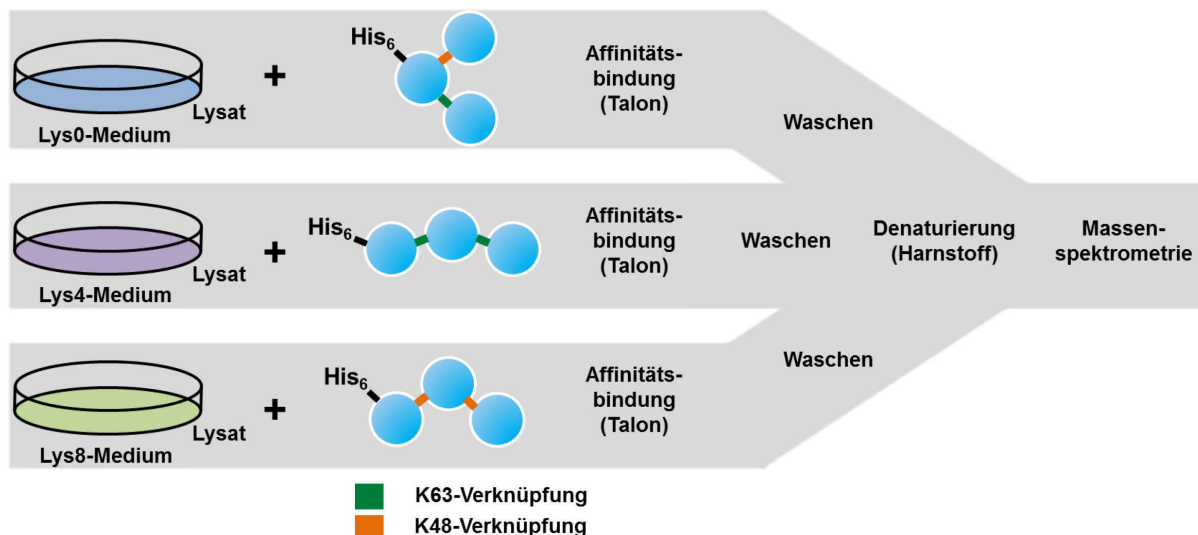
Eine weitere erstaunliche Beobachtung in den *in vitro* Verlängerungsreaktionen war die Verknüpfung von Ubiquitinketten durch die Ubiquitinierungskaskade (2.1.6). K48- oder K63-Tetraubiquitin wurde von dem E1-Enzym aktiviert (Abbildung 2-16), auf das E2 Ubc7 übertragen und mit dem distalen Ende einer weiteren Kette verknüpft (Abbildung 2-15). Die Reaktionen laufen vermutlich aufgrund der gestiegenen Größe des Donormoleküls wesentlich langsamer ab, sind aber mechanistisch möglich. Eine Untersuchung der Ketten-Ketten-Verknüpfung auf zellulärer Ebene ist kompliziert durchzuführen, da freie Ketten in sehr geringen Konzentrationen vorhanden sind, leicht durch Deubiquitinasen abgebaut werden und die beteiligten Prozesse schwer zuzuordnen sind.

### **3.6 Identifizierung von ubiquitinbindenden Domänen mit Präferenz für K48/K63-verzweigte Ketten**

Werden K48/K63-Ketten *in vivo* gebildet, ist es wahrscheinlich, dass in Annäherung an die klassische Verarbeitung von Ubiquitinsignalen ubiquitinbindende Domänen existieren, die verzweigte Ketten erkennen. Hierbei sind zwei verschiedene Mechanismen denkbar. Zum



einen könnte eine spezialisierte Bindung direkt an den Verzweigungspunkt des Ubiquitinakzeptors erfolgen. Zum anderen könnten verzweigte Ketten durch einen modularen Proteinaufbau mit mehreren Domänen, die unterschiedliche Affinitäten/Orientierungen und verbindende Regionen (*linker*) aufweisen, erkannt werden. Potentielle ubiquitinbindende Proteine dieser Art, können möglicherweise in SILAC (*Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture*)-basierten Kopräzipitationsexperimenten identifiziert werden (Abbildung 3-2): Zellen desselben Hefestammes/Zelllinie werden in drei Kulturen mit verschiedenen Aminosäureisotopen (SILAC-Isotope) kultiviert. Die Zelllysate werden entweder mit K48/K63-verzweigten bzw. K63- oder K48-verknüpften Triubiquitinmolekülen inkubiert, mittels Affinitätschromatographie immobilisiert und gewaschen. Eine chemische Denaturierung löst Interaktionspartner, während die eingesetzten Ketten an der stationären Phase gebunden bleiben. Anhand der Isotopenmarkierung kann eine mögliche Anreicherung von Proteinen an den verzweigten Ketten im Vergleich zu den homotypischen Trimeren bestimmt werden. Vermutlich ist es notwendig, geeignete Kulturbedingungen zu finden, die eine Synthese von verzweigten Ketten in Zellen auslösen. Oxidativer Stress [134], Hitzeschock [140], Reduktionsmittel und UV-Bestrahlung [141] sollten einzeln oder in Kombination angewendet und die Ubiquitinierung mittels spezifischer Antikörper gegen eine K48- oder K63-Verknüpfung überprüft werden. Aufgrund der bekannt schwachen Wechselwirkungen von ubiquitinbindenden Domänen und deren geringen Konzentrationen in Zellen ist gegebenenfalls eine kovalente Fixierung der Bindungspartner an die Ketten erforderlich (z.B. *crosslinking*).



**Abbildung 3-2: Identifizierung von ubiquitinbindenden Domänen mit einer Erkennungsfunktion von K48/K63-verzweigten Ubiquitinketten.** Gezeigt ist der schematische Ablauf eines SILAC-basierten (*Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture*) Kopräzipitationsexperiments. Vorgefertigte Triubiquitinmoleküle, die K48/K63-verzweigt (■, ■) oder K63- (■) oder K48-verknüpft (■) sind, tragen eine Affinitätsmarkierung (His<sub>6</sub>-Markierung) und werden getrennt mit Zelllysaten des gleichen Hefestammes/Zelllinie aus verschiedenen Nährmedien inkubiert. Die Medien unterscheiden sich in der enthaltenen Aminosäure Lysin, die entweder nicht-markiert (Lys0) oder in zwei isotonenmarkierten Formen (Lys4, Lys8) den auxotrophen Zellen bereitgestellt wird. Nach der Bindung von Interaktionspartnern an die Triubiquitinmoleküle werden diese durch Affinitätsbindung immobilisiert (Talon) und Verunreinigungen entfernt. Die drei Ansätze werden vereinigt und Proteine, die mit den Ubiquitinketten interagieren, denaturierend gelöst. Die Immobilisierung der Ketten bleibt bestehen. In massenspektrometrischen Untersuchungen können potentielle Bindungspartner von Ubiquitinketten identifiziert werden, die eine Präferenz für die K48/K63-Verzweigung aufweisen.

### 3.7 Charakterisierung der proteasomalen DUBs Ubp6 und Rpn11 in Isolation

Nach einer initialen Ubiquitinierung können Ubiquitinsignale durch weitere Ubiquitinligasen und Deubiquitinasen umgestaltet und die Signalantwort den zellulären Bedingungen angepasst werden. Am Proteasom beispielsweise steuert das E4 Hul5 und das DUB Ubp6 die Feinabstimmung des Proteinabbaus [140,142,143]. Wird die Aktivität von Hul5 unterbunden, verlangsamt sich der Abbau von einigen Proteinen [30,140,144]. Ubp6 kürzt Ubiquitinketten von Substratproteinen, verzögert somit deren proteasomalen Abbau (gezeigt für das Säugetierortholog Usp14, [120]) und regeneriert Monoubiquitin. Zellen ohne Ubp6 mangelt es an Ubiquitin [18,145], da dies mit den Substratproteinen abgebaut wird [146,147]. Eine erste Charakterisierung von Ubp6 beschreibt einen Kettenabbau vom distalen Ende, gezeigt mit K48-Ub<sub>3</sub> [148]. Reaktionen mit Tetraubiquitinmolekülen erweitern den bisherigen

Mechanismus des Kettenabbaus (Abbildung 2-33, [149]). Während der Hydrolyse von K48-Ub<sub>4</sub> akkumuliert Ub<sub>2</sub> übermäßig stark im Vergleich zu Ub<sub>3</sub>. Das DUB scheint präferentiell die mittlere Isopeptidbindung des Tetramers zu trennen. Bei einer Abspaltung der distalen Ubiquitineinheiten sollten schrittweise die einzelnen Spaltprodukte (Ub<sub>3</sub>, Ub<sub>2</sub>, Ub) in vergleichbaren Mengen gebildet werden. Dieses Abbauprofil ist in Reaktionen mit K63-Ub<sub>4</sub> zu beobachten. Ubp6 folgt vermutlich unterschiedlichen Abbaumechanismen, die abhängig von der Verknüpfungsart der Substratkette sind. Gemäß einer regulierenden Funktion während des proteasomalen Proteinabbaus [30,120] und der Regeneration von Ubiquitin prozessiert Ubp6 K48-Ub<sub>4</sub> signifikant schneller als K63-Ketten. Ubp6 scheint bei K63-Verknüpfungen eine langsame Exoisopeptidase zu sein, die bei K48-verknüpften Substraten vermutlich durch eine starke Endoisopeptidaseaktivität ergänzt wird. Ubp6 und Rpn11 (POH1) zeigen eine geringe Aktivität in Isolation (2.2.1) [18,148,150]. Die Inkorporation in das Proteasom stimuliert beide DUBs. Dies kann bei Rpn8/11 bereits durch die Assoziation mit Rpn5, Rpn-6 und Rpn-9 beobachtet werden. Die Abbaureaktion sowohl von K48- als auch K63-Ub<sub>4</sub> ist im sogenannten *Lid-core*-Komplex beschleunigt. Proteasomale Untereinheiten scheinen die Deubiquitinierungsaktivität zu gestalten, wie für den Unterkomplex *lid* [151], das 19S regulatorische Partikel [115] und das vollständige 26S-Proteasom [118] berichtet wurde. Es ist anzunehmen, dass die hier gezeigte basale Aktivität durch konformationelle Umgestaltungen der *lid*, die durch die Hydrolyse von ATP (Rpt-Untereinheiten) angetrieben werden, gesteigert wird [117]. Die Deubiquitinierung von Substratproteinen scheint eng mit der ATP-abhängigen Proteinentfaltung gekoppelt zu sein [115,118], die kurz vor der Translokation in die proteolytische Kammer des Kernpartikels stattfindet. *In vitro* Untersuchungen mit Diubiquitin lassen keine Spezifität der Metalloprotease Rpn11 bezüglich der Kettenverknüpfung erkennen [152]. Hingegen zeigen Reaktionen mit Tetraubiquitin und Rpn11, das als Heterodimer oder komplexgebunden vorliegt, einen schnelleren Abbau von K63-Ub<sub>4</sub>. Sowohl K48- als auch K63-Ketten scheinen durch eine Exoisopeptidaseaktivität des DUBs abgebaut zu werden. Rpn11 gilt als kappendes DUB, welches Ubiquitinsignale am Ansatz zu den Substratproteinen freisetzt [115]. Anhand von Tetraubiquitinmolekülen mit einer Fluoreszenzmarkierung an je einem der beiden Kettenenden könnte ein proximaler Abbau von einer distalen Abspaltung unterschieden werden. In den gezeigten Experimenten sind die Fluorophore willkürlich über das Polymer verteilt. Die Charakterisierung der DUBs Ubp6 und Rpn11 in Isolation lässt deren grundlegende Aktivitäten und Spezifitäten erkennen, die anscheinend durch weitere proteasomale Einheiten moduliert werden. Die Verwendung von längeren Ubiquitinketten ermöglicht eine realistischere Analyse des Abbaus von

Polyubiquitinsignalen im Vergleich zu Experimenten mit Diubiquitin. Durch Fluoreszenz-basierte Untersuchungsansätze können anspruchsvollere Fragestellungen gestellt und detailliertere Aussagen über die Wirkweise von DUBs gewonnen werden. Ähnlich wie bei Untersuchungen des Kettenaufbaus können durch fluoreszenzspektroskopische Methoden Deubiquitinierungsreaktionen verfolgt und kinetische Parameter bestimmt werden. Für Spaltungen von kürzeren Ketten bieten sich FRET-basierte Experimente an, während bei längeren Ketten Fluoreszenzanisotropiemessungen zweckmäßig sind (2.2.2). Ein mittlerweile kommerziell erhältlicher Inhibitor von Usp14 (Ubp6) wurde durch ein Fluoreszenz-basiertes Hochdurchsatzverfahren identifiziert [120]. Die Emission des Fluorophors AMC (7-amino-4-methylcoumarin) ist gering, solange der Farbstoff an Ubiquitin gebunden ist. Durch die Spaltung der Amidbindung wird die Fluoreszenzlöschung aufgehoben und die Emission steigt.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Bakterien- und Hefestämme

##### Bakterienstämme

XL1-Blue

*E. coli* *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rk-mk+), supE44, relA1, λ-lac* [F' *proAB lacIqZΔM15, Tn10* (TetR)]

BL21 (DE3)

*E. coli* B F- *dcm ompT hsdS(rB-mB-), gal λ*(DE3)

##### Hefestamm

YTX141 [76]

*Δcuel::HIS3, prc1-1, trp1-1 (am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3, -112, MATα*

Der verwendete Hefestamm ist ein Abkömmling des Stammes YW01 und auxotroph für einige Aminosäure und Nukleinsäuren. Plasmide, die entsprechende Auxotrophiemarker enthalten, sind essentiell für das Wachstum der Hefezellen in SD-Minimalmedium. Wird kein Plasmid benötigt, können die Hefezellen in YPD kultiviert werden.

#### 4.1.2 Plasmide

Plasmid	Insert	Vektor	Quelle
pMD10	hUb	pETM60	[153]
pMD11	hUb mit C-terminaler His <sub>6</sub> -Fusion (Ub <sup>6His</sup> )	pETM60	diese Studie
pMD12	hUb S20C	pETM60	diese Studie
pMD13	hUb S20C mit C-terminaler His <sub>6</sub> -Fusion	pETM60	diese Studie
pMD14	hUb R42A	pETM60	diese Studie
pMD15	hUb R42A mit C-terminaler His <sub>6</sub> -Fusion	pETM60	diese Studie
pMD16	hUb K48R	pETM60	diese Studie
pMD17	hUb K48R mit C-terminaler His <sub>6</sub> -Fusion	pETM60	diese Studie
pMD18	hUb K63R	pETM60	diese Studie
pMD19	lineares Ub <sub>2</sub>	pET39b(+)	[153]

#### 4.1 Material

pMD20	lineares Ub <sub>4</sub>	pET39b(+)	[153]
pMD21	linear-Ub <sub>4</sub> <sup>6His</sup> (Ub1,2,3 K48R)	pET39b(+)	diese Studie
pMD22	linear-Ub <sub>4</sub> <sup>6His</sup> (Ub2,3,4 K48R)	pET39b(+)	diese Studie
pTX481	Ube1 (hE1)	pET32	[154]
pTX249	Ubc7 (Aminosäure 2-165)	pGEX6P1	[99]
pTX251	Ubc7 C89S	pGEX6P1	Prof. Sommer, Berlin
pTX315	Hrd1 (Aminosäure 325-550)	pGEX6P1	[99]
pTX341	Hrd1 (Aminosäure 325-550) C399S	pGEX6p1	Prof. Sommer, Berlin
pTX410	Cue1ΔTM (Aminosäure 24-203) mit C-terminaler His <sub>6</sub> -Fusion; alias cCue1	pGEX6P1	[99]
pMD23	cCue1 mit E96A; alias cCue1 E96A	pGEX6P1	diese Studie
pMD24	cCue1 mit E100A; alias cCue1 E100A	pGEX6P1	diese Studie
pMD25	cCue1 mit L103A; alias cCue1 L103A	pGEX6P1	diese Studie
pTX411	cCue1 mit L,A,P76,77,78R,G,A; alias cCue1 RGA	pGEX6P1	[99]
pTX397	Cue1; bp -450 bis +609 (XhoI, NotI)	pRS415	[99]
pLP22	Cue1 E96A, abgeleitet von pTX397	pRS415	diese Studie
pLP23	Cue1 E100A, abgeleitet von pTX397	pRS415	diese Studie
pLP24	Cue1 L103A, abgeleitet von pTX397	pRS415	diese Studie
pTX386	Cue1 RGA, abgeleitet von pTX397	pRS415	[99]
pMD26	Cdc34	pGEX6p1	Prof. Dötsch, Frankfurt
pMD27	Ube2k	pET24	[155]
pMD28	Ubc13	pGEX6p1	[149]
pMD29	Uev1a	pGEX6p1	[149]
pMD30	Usp2 <sub>cat</sub>	pET15b	Prof. Glickman, Haifa
pMD31	Ubp6	pQE30	[149]
pMD32	Rpn8, Rpn11-His <sub>6</sub>	pET28b	[149]
pMD33	Rpn5, -6, -8, -9, und -11-His <sub>6</sub> ( <i>lid core</i> )	pETDuet1	[149]
pRARE2	kodiert <i>argU</i> , <i>argW</i> , <i>argX</i> , <i>glyT</i> , <i>ileX</i> , <i>leuW</i> , <i>metT</i> , <i>proL</i> , <i>thrT</i> , <i>thrU</i> und <i>tyrU</i>	pACYC184	Novagen
pGEM-T	Desoxythymidin-Überhänge, kein Insert		Promega

## 4.1.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide	Zielgen	Sequenz 5'→3'	Verwendung	f/r
hUb_*77S pETM60 fw	hUb	TGA GAC TTC GTG GTG GTT CAG GTT CTG GTC ATC	C-terminale His6-Fusion	f
hUb_*77S pETM60 rev	hUb	GAT GAC CAG AAC CTG AAC CAC CAC GAA GTC TCA	C-terminale His6-Fusion	r
hUb_S87* pETM60 fw	hUb	TGG TCA TCA CCA TCA CCA TCA CTA GGC GGG TGA GAA T	C-terminale His6-Fusion	f
hUb_S87* pETM60 rev	hUb	ATT CTC ACC CGC CTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG ACC A	C-terminale His6-Fusion	r
hUb_S20C pETM60 fw	hUb	CTA GAA GTT GAA TCT TGC GAT ACC ATC GAC AAC G	S20C	f
hUb_S20C pETM60 rev	hUb	CGT TGT CGA TGG TAT CGC AAG ATT CAA CTT CTA G	S20C	r
hUb_R42A_pET M60_fw	hUb	AAT ACC TCC TGA TCA GCA GGC ACT GAT CTT TGC TGG C	R42A	f
hUb_R42A_pET M60_rev	hUb	GCC AGC AAA GAT CAG TGC CTG CTG ATC AGG AGG TAT T	R42A	r
hUb_K48R pETM60 fw	hUb	AGA GAC TGA TCT TTG CTG GCA GGC AGC TGG AAG A	K48R	f
hUb_K48R pETM60 rev	hUb	TCT TCC AGC TGC CTG CCA GCA AAG ATC AGT CTC T	K48R	r
hUb_K63R pETM60 fw	hUb	ACG TAC TTT GTC TGA CTA CAA TAT TCAAAG GGA GTC TAC TCT TCA	K63R	f
hUb_K63R pETM60 rev	hUb	TGA AGA GTA GAC TCC CTT TGA ATA TTG TAG TCA GAC AAA GTA CGT	K63R	r
Ub1_K48R linUb <sub>4</sub> fw	lin hUb <sub>4</sub>	AGC GCT TGA TTT TCG CTG GCA GAC AAT TAG AAG ATG G	K48R in Ub1	f
Ub1_K48R linUb <sub>4</sub> rev	lin hUb <sub>4</sub>	CCA TCT TCT AAT TGT CTG CCA GCG AAAATC AAG CGC T	K48R in Ub1	r
Ub2_K48R linUb <sub>4</sub> fw	lin hUb <sub>4</sub>	CGT CTG ATC TTT GCA GGC AGG CAG CTC GAA G	K48R in Ub2	f
Ub2_K48R	lin hUb <sub>4</sub>	CTT CGA GCT GCC TGC CTG CAA	K48R in Ub2	r

## 4.1 Material

linUb <sub>4</sub> rev		AGA TCA GAC G		
Ub3_K48R	lin hUb <sub>4</sub>	GCC TTA TCT TTG CCG GCA GAC	K48R in Ub3	f
linUb <sub>4</sub> fw		AAC TCG AAG ATG G		
Ub3_K48R	lin hUb <sub>4</sub>	CCA TCT TCG AGT TGT CTG CCG	K48R in Ub3	r
linUb <sub>4</sub> rev		GCA AAG ATA AGG C		
Ub4_K48R	lin hUb <sub>4</sub>	ACA GCG CTT AAT CTT TGC AGG	K48R in Ub4	f
linUb <sub>4</sub> fw		AAG ACAGCT GGA AGA T		
Ub4_K48R	lin hUb <sub>4</sub>	ATC TTC CAG CTG TCT TCC TGC	K48R in Ub4	r
linUb <sub>4</sub> rev		AAA GAT TAA GCG CTG T		
CUE E96A fw	Cue1 <sup>*</sup>	AAC ACA GGC TCA GTC GCG GAA ACA GTG GAA AGG	E96A	f
CUE E96A rev	Cue1 <sup>*</sup>	CCT TTC CAC TGT TTC CGC GAC TGA GCC TGT GTT	E96A	r
CUE E100A fw	Cue1 <sup>*</sup>	GTC GAG GAA ACA GTG GCA AGG TAC TTG CGT GGT	E100A	f
CUE E100A rev	Cue1 <sup>*</sup>	ACC ACG CAA GTA CCT TGC CAC TGT TTC CTC GAC	E100A	r
CUE L103A fw	Cue1 <sup>*</sup>	GGA AAC AGT GGA AAG GTA CGC GCG TGG TGA TGA ATT CAG C	L103A	f
CUE L103A rev	Cue1 <sup>*</sup>	GCT GAA TTC ATC ACC ACG CGC GTA CCT TTC CAC TGT TTC C	L103A	r

<sup>\*</sup> in pTX410 und pTX397

### 4.1.4 Antikörper und Enzyme

Antikörper gerichtet gegen	Verdünnung	Quelle
<b>primäre Antikörper</b>		
Cue1	1:10000	[76]
Sec61	1:20000	[76]
Ubc6	1:8000	[156]
Ubiquitin UG9510	1:2000	Enzo Lifesciences
<b>sekundäre Antikörper (HRP-konjugiert)</b>		
Kaninchen A0545	1:10000	Sigma



Der Antikörper gerichtet gegen Ubiquitin wurde mit 2 % (w/v) BSA in 1x TBT-Puffer angesetzt, alle anderen mit 5 % (w/v) Milchpulver in 1x TBT-Puffer. Die Lösungen des sekundären Antikörpers wurden entsprechend des primären Antikörpers hergestellt.

Apyrase	Sigma
DNase I	Roche
Expand HF DNA-Polymerase	Roche
Lys-C Protease, MS Grade	Life Technologies
Pfu Ultra HF DNA-Polymerase	Stratagene
PreScission Protease	GE-Healthcare
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
TEV Protease	Sigma
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
Usp8	Boston Biochem

#### 4.1.5 Größenstandards

ColorPlus Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs
Protein Molecular Weight Marker	Fermentas
1 kb DNA Ladder	Invitrogen

#### 4.1.6 Chemikalien

Gewöhnliche Chemikalien, die hier nicht aufgelistet sind, wurden von Roth, Sigma oder VWR bezogen.

Acrylamid (40 % (w/v))	Serva
Agarose	Invitrogen
Alexa Fluor 488 C5 Maleimide	Life Technologies
Alexa Fluor 594 C5 Maleimide	Life Technologies
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Ampicillin	Roth
β-Mercaptoethanol	Sigma
Bacto Agar	BD Biosciences
Bacto Pepton	BD Biosciences
Bacto Trypton	BD Biosciences
Bacto Yeast Extract BD	Biosciences

Bovines Serum Albumin (BSA), Fraktion V	Roche
Brij 58	BioChemica
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid (X-Gal)	Roth
Bromphenolblau	Sigma
Coomassie Brilliant-blau R-250	Serva
Cycloheximid	Fluka
L-Cystein	Sigma
Desoxyribonukleinsäuretriphosphate (dNTPs)	Roche
Dimetylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
N-Ethylmaleimid (NEM)	Sigma
Glutathione, Reduced, Free Acid	Calbiochem
Glycerin	Sigma
Harnstoff	Roth
HEPES	Sigma
Heringssperma-DNA	Sigma
L-Histidin	Sigma
1-Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Roth
Kanamycin	Roth
L-Leucin	Sigma
L-Lysin	Sigma
Magermilchpulver	Roth
L-Methionin	Sigma
N,N-Dimethylformamide	Sigma
N,N'-Methylenbisacrylamid (2 % (w/v))	Serva
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
PEG 3350	Sigma
Perchlorsäure HClO <sub>4</sub> 70%	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
RedSafe	IntRON
N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma
Tris	Roth
L-Tryptophan	Sigma

Uracil	Fluka
Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren	BD biosciences

#### 4.1.7 Lösungen, Puffer und Nährmedien

Die Prozentangaben bei der Zusammensetzung der Nährmedien sind (w/v)-Verhältnisse. Es wurde ausschließlich Wasser aufbereitet durch ein Millipore-DI-Wasser-Aufreinigungssystem verwendet.

##### 4.1.7.1 Nährmedien für Bakterienkulturen

LB-Medium (*lysogeny broth*)

1 % Bacto-Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 1 % NaCl

TB-Medium (*terrific broth*)

1,2 % Trypton; 2,4 % Hefeextrakt; 0,4 % Glycerol; 17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 72 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Die Nährmedien wurden vor Gebrauch 25 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Für die Herstellung von festen Nährböden wurde dem LB-Medium 2 % Agar-Agar zugefügt. Nach Abkühlen des autoklavierten Mediums wurden Zusätze wie Antibiotika zugegeben (50 µg/ml Ampicillin; 25 µg/ml Kanamycin; X-Gal/IPTG-Nährböden 1 mM IPTG, 400 µM X-Gal).

SOC-Medium (*super optimal broth with catabolite repression*)

2 % Bacto-Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 0,4 % D-Glukose; 10 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 2,5 mM KCl; pH 7,4

Die Lösung wurde sterilfiltriert.

##### 4.1.7.2 Nährmedien für Hefekulturen

YPD-Vollmedium (*yeast peptone dextrose*)

2 % Bacto-Pepton; 1 % Hefeextrakt; 2 % D-Glukose; pH 5,5

Die Lösung bestehend aus Pepton und Hefeextrakt wurde autoklaviert und mit sterilfiltrierter 20 % D-Glukoselösung versetzt.

## 4.1 Material

### SD-Minimalmedium (*synthetic defined*)

0,67 % Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren; 2 % D-Glukose; 20 mg/l L-Histidin; 30 mg/l L-Leucin; 30 mg/l L-Lysin; 20 mg/l L-Tryptophan; 20 mg/l Adeninsulfat; 20 mg/l Uracil

Die Lösung wurde sterilfiltriert.

Feste Nährböden beinhalten 2 % Agar-Agar.

### 4.1.7.3 Lösungen und Puffer für molekular- und zellbiologische Methoden

Lösung 1 (JetStar)	50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; 0,1 mg/ml RNaseA; pH 8,0
Lösung 2 (JetStar)	200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS
Lösung 3 (JetStar)	3,2 M KOAc pH 5,5; 11,5 % (v/v) Essigsäure
Hefeaufschlusspuffer	50 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 % (w/v) SDS; 1 mM PMSF
Stopplösung für CHX-Experiment	30 mM NaN <sub>3</sub> ; 1 mM PMSF
SDS-Probenpuffer (4x) [157]	250 mM Tris/HCl pH 6,8; 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 40 % (v/v) Glycerol; 16 % (w/v) SDS; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau;
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris/HCl; 7 % (v/v) Essigsäure; 50 mM EDTA; pH 8,2
TE-Puffer (10x)	100 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; pH 7,4
Trafo-Lösung 1	100 mM LiOAc; 1x TE pH 7,5
Trafo-Lösung 2	100 mM LiOAc; 1x TE pH 7,5; 40 % (w/v) PEG 3350
DNS-Probenpuffer (5x)	50 % (v/v) Glycerin; 5 mM EDTA; 1,25 % (w/v) OrangeG

### 4.1.7.4 Lösungen und Puffer für biochemische Methoden

Sämtliche Lösungen für biochemische Zwecke wurden frisch angesetzt und sterilfiltriert.

ATP	100 mM ATP (diNa-Salz), pH 7-8 mit 10 M NaOH eingestellt
Coomassie-Färbelösung	45 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliantblau R-250
Coomassie-Entfärber	40 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure

DNase I Mix (1000x)	1 mg/ml DNase I in 1 M MgCl <sub>2</sub>
Elutionspuffer für GST-Fusionsproteine	1x PBS, 20 mM reduziertes Glutathion, pH-Wert mit 10 M NaOH auf 7,5 eingestellt
Elutionspuffer für His <sub>6</sub> -Fusionsproteine	1x PBS (Reinigung von E1: 2x PBS), 300 mM Imidazol
Gelfiltrationspuffer	50 mM Tris/HCl pH 8 für Ubiquitin 1x PBS für Ubiquitin S20C, E2 und E3-Enzyme 2x PBS für E1
Harnstoff-Probenpuffer (4x) [158]	8 M Harnstoff; 200 mM Tris/HCl pH 6,8; 5 % (w/v) SDS; 0,1 mM EDTA; 0,03 % (w/v) Bromphenolblau; 1,5 % (w/v) DTT
Lysepuffer für GST-Fusionsproteine	1x PBS, 1x DNase I Mix, Complete EDTA-free Proteinaseinhibitoren
Lysepuffer für His <sub>6</sub> -Fusionsproteine	1x PBS (Reinigung von E1: 2x PBS), 10 mM Imidazol, 1x DNase I Mix, Complete EDTA-free Proteinaseinhibitoren
Lysepuffer für Ubiquitin	50 mM Tris/HCl, 1x DNase I Mix, Complete EDTA-free Proteinaseinhibitoren
PBS (10x)	1,4 M NaCl; 27 mM KCl; 101 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,5
PBS-Brij	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,2 % (w/v) Brij; pH 7,5
PreScission oder TEV-Reaktionspuffer	1x PBS
SDS-PAGE (Sammelgel)	3 % (v/v) Acrylamid; 0,15 % (v/v) Bisacrylamid; 125 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1 (v/v) % SDS; 0,25 % (v/v) TEMED; 2,5 % (v/v) APS
SDS-PAGE (Trenngel 9 %)	9 % (v/v) Acrylamid; 0,06 % (v/v) Bisacrylamid; 500 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1 (v/v) % SDS; 0,02 % (v/v) TEMED; 0,1 % (v/v) APS
SDS-PAGE (Trenngel 18 %)	18 % (v/v) Acrylamid; 0,09 % (v/v) Bisacrylamid; 500 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1 (v/v) % SDS; 0,02 % (v/v) TEMED; 0,1 % (v/v) APS

## 4.1 Material

SDS-PAGE-Laufpuffer (5x)	1,5 % (w/v) Tris-Base; 7,2 % (w/v) Glycin; 0,5 % (w/v) SDS
TBT (10x)	500 mM Tris/HCl; 1,5 M NaCl; 1 % (v/v) Tween 20; pH 7,5
Waschpuffer für GST-Fusionsproteine	1x PBS
Waschpuffer für His <sub>6</sub> -Fusionsproteine	1x PBS (Reinigung von E1: 2x PBS), 10 mM Imidazol
<i>Western-Blot</i> -Transferpuffer	1,1 % (w/v) Glycin; 0,24 % (w/v) Tris-Base; 25 % (v/v) Methanol; 0,01 % (w/v) SDS

### 4.1.8 Verbrauchsmaterialien

Amicon Ultra Konzentrator (3, 10, 30K)	Millipore
BioMax MR Film	Kodak
Centri Pure P25	emp Biotech
Complete EDTA-free Proteinaseinhibitoren	Roche
DC Protein Assay	Bio-Rad
DNS-Sequenzierung	STRATEC    Molecular    GmbH bzw. Source Bioscience
Expand High Fidelity PCR System	Roche Applied Science
Glutathione Sepharose 4 Fast Flow	GE-Healthcare
JetStar Plasmid Purification Kits	Genomed GmbH
MF-Membran Filter (VSWP) für Dialyse	Millipore
Minisart Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm)	Sartorius Stedim
Nap5 Sephadex	GE-Healthcare
Oligonukleotide	BioTez
pGEM-T Easy Vector System	Promega
PVDF-Membran (Porengröße 0,45 µm)	Roth
QuikChange Site Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
Rotilabor Spritzenfilter (0,45 und 0,2 µm)	Roth
Talon Metal Affinity Resins	Clontech
Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus	PerkinElmer
Whatman Blotting-Papier	Roth
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega

#### 4.1.9 Geräte

Äkta FPLC (prime und explorer)	Amersham Pharmacia Biotech
GSTrap FF Columns	GE-Healthcare
HiLoad Superdex 16/600 75p	GE-Healthcare
HiLoad Superdex 16/600 200p	GE-Healthcare
HiLoad Superdex 26/600 75p	GE-Healthcare
HiPrep 26/10 Desalting	Amersham Bioscience
HiTrap TALON crude	GE-Healthcare
Brutschrank B500	Memmert
Centrifuge 5415D	Eppendorf
Centrifuge 5417R	Eppendorf
Durchlichtmikroskop Standard 25	Zeiss
Electrophoresis Mighty Small II	Hoefer
EmulsiFlex-C5	Avestin
Galaxy MiniStar	VWR
Gel dryer Model 583	BioRad
Gene Pulser	BioRad
Inkubationsschüttler Innova 44	New Brunswick Scientific
Kühlzentrifuge 4K15 Sigma	Laboratory Centrifuges
Magnetrührer IKamag RCT	IKA
Mighty Small Transfer Tank TE22	Hoefer
Mini Horizontal Agarose Electrophoresis Unit HE33	Hoefer
NanoDrop 2000	Thermo Scientific
PCR-Maschine Primus 25	peQLab
pH-Meter	Schott
Typhoon FLA9500 Biomolecular Imager	GE-Healthcare
or FLA 3000	FujiFilm
Power Pac 300	BioRad
Spektralfluorimeter Fluoromax 4	Horiba, Ltd.
Fluoreszenzküvette 105.251-QS,	Hellma
3 mm Schichtdicke, Z:15	
Wasserbad ECO RE 620	Lauda
Spectrophotometer Ultrospec 3100 pro	Amersham Bioscience
Ultra-Mikro-Küvette 105.202-QS	Hellma

Einmalküvetten REF 67.742	Sarstedt
Thermomixer Compact	Eppendorf
Ultrazentrifuge Sorvall RC 6+	Thermo Scientific
Rotor FiberLite F10-4x1000 LEX	Thermo Scientific
Rotor FiberLite F10-6x500y	Thermo Scientific
Rotor SS34	Thermo Scientific
UV-Transilluminator Gel-Doc	peQLab
Vibrax VXR basic	IKA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad Fisons DC1 W13	HAAKE
X-Ray Film Processor RGII	Fuji

### 4.1.10 Computerprogramme

EndNote	Thomson Reuters
FluorEssence Software	Horiba, Ltd.
ImageQuant TL software	GE-Healthcare
Office	Microsoft
Photoshop CS5.1	Adobe
PyMOL 0.99rc6 (Open-Source)	DeLano Scientific LLC, 2006
SigmaPlot Version 12	Systat Software, Inc.



## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Molekularbiologische Methoden

Sämtliche Lösungen und Puffer für molekularbiologische Methoden sind in 4.1.7.3 zusammengefasst.

#### 4.2.1.1 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNS

Plasmid-DNS amplifiziert in *E. coli* XL-1 Zellen wurde mithilfe des *JetStar Plasmid Purification Kits* isoliert. Eine Übernachtskultur (37 °C, 200 Upm) wurde mit einer Bakterienkolonie angeimpft und am nächsten Tag bei 14000 x g für 30 s abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 150 µl Lösung 1 (*JetStar*) gründlich resuspendiert und für die Lyse mit 150 µl Lösung 2 (*JetStar*) versetzt. Nachdem die Reaktionsgefäße dreimal vorsichtig invertiert wurden, wurde 150 µl Lösung 3 (*JetStar*) zugegeben. Die ausgefallenen Bakterienproteine wurden durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 4 °C und 20000 x g pelletiert. Die DNS im Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 100 % Ethanol gefällt und bei 20000 x g für 5 min abzentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 70 % (v/v) Ethanol wurde das DNS-Pellet getrocknet und in 40 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die Konzentration wurde bei 260 nm mit einem Mikrovolumen Spektralphotometer (NanoDrop) bestimmt. Stärkere Verunreinigungen der Proben wurden mit dem *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* beseitigt.

#### 4.2.1.2 Restriktionsverdau und DNS-Ligation

Für den Restriktionsverdau von DNS setzten sich die Ansätze von 10 oder 50 µl entsprechend den Angaben des *NEBcloner* (*New England Biolabs*) zusammen. Je nach Größe des Polymers und der weiteren Verwendung wurden 0,5 µg bis 5 µg DNS bei den empfohlenen Temperaturen für etwa zwei Stunden inkubiert. Die Ligation von DNS-Fragmenten erfolgte meist über Nacht bei 16 °C mit T4-DNA-Ligase in 10 µl Ansätzen. DNS-Fragmente wurden direkt in den Zielvektoren ligiert oder alternativ in pGEM-T *Easy* Vektoren nach Herstellerangaben gesichert. Da die *Expand HF* DNA-Polymerase Desoxyadenosin-Überhängen bildet, können die synthetisierten Fragmente über Desoxythymidin-Überhänge des pGEM-T Vektors integriert werden. Für eine Transformation in *E. coli*-XL1-Blue wurden Ligationsansätze mithilfe von Dialysemembranen (MF-Membran Filter) in Petrischalen gegen Wasser

dialysiert. Über eine Blau/Weiß-Selektion auf IPTG/X-Gal-Nährböden wurde die Integration von DNS-Fragmenten in pGEM-T Vektoren beurteilt.

### 4.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese trennt DNS-Fragmente verschiedener Größen im elektrischen Feld. Für kleine DNS-Fragmente (<1 kb) wurden Gele mit 2 % (w/v) Agarose, für Plasmide Gele mit 1 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer verwendet. Durch Aufkochen löst sich die Agarose in dem Puffer. Nach Abkühlung auf etwa 50 °C wurde der Fluoreszenzfarbstoff *RedSafe* zugegeben (1:30000), der in DNS-Doppelstränge interkaliert. Proben wurden mit DNS-Probenpuffer versetzt und DNS-Fragmente bei einer Spannung von 120 V für 15-30 min in

1x TAE-Puffer aufgetrennt. Durch UV-Beleuchtung im UV-Transilluminator (Absorptionsmaximum des Farbstoffes bei 309 nm) wurden die aufgetrennten DNS-Fragmente sichtbar gemacht.

### 4.2.1.4 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Bei schwacher UV-Beleuchtung wurden die gewünschten DNS-Fragmente mittels Skalpell ausgeschnitten und durch das *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* entsprechend der empfohlenen Vorgehensweise extrahiert.

### 4.2.1.5 Polymerasekettenreaktion

DNS-Vervielfältigungen von kurzen Sequenzen oder aus analytischen Gründen wurden mit dem *Expand-High Fidelity* PCR System durchgeführt. Längere Nukleotidsequenzen wurden durch die *Pfu Ultra HF* DNA-Polymerase amplifiziert und Punktmutationen mit dem *QuikChange Site Directed Mutagenesis* System eingefügt. Abweichend zu dem Protokoll wurden Polymerasekettenreaktionen nicht mit Mineralöl überschichtet und das Produkt in ein neues Reaktionsgefäß überführt bevor 0,5 U/μl DpnI zugegeben wurden. Nach mehrstündiger Inkubation bei 37 °C wurde 1 μl der DpnI-behandelten DNS in einem Transformationsansatz mit XL1-Blue-Zellen eingesetzt.

**PCR-Ansätze****mit Expand HF DNA-Polymerase****mit Pfu Ultra HF DNA-Polymerase**

1x Expand-Puffer	1x Pfu Ultra HF -Puffer
200 µM dNTPs	200 µM dNTPs
0,2 µM fw-Oligonukleotid	0,2 µM fw-Oligonukleotid
0,2 µM rev-Oligonukleotid	0,2 µM rev-Oligonukleotid
etwa 50 ng Plasmid-DNS	150 ng Plasmid-DNS
3,5 U DNS-Polymerase	2,5 U DNS-Polymerase
ddH <sub>2</sub> O für 50 µl Endvolumen	ddH <sub>2</sub> O für 50 µl Endvolumen
	optional mit 3 % (v/v) DMSO

**PCR-Programm für DNS-Vervielfältigung**

Zyklusschritt	Temperatur (°C)	Dauer	Anzahl der Zyklen
Anfängliche Denaturierung	95	4 min	1
Denaturierung	95	45 s	} 25-35
Primeranlagerung	48-52	45 s	
Verlängerung	72	2 min/kb	
Finale Verlängerung	72	5	1

**PCR-Programm für Punktmutagenese**

Zyklusschritt	Temperatur (°C)	Dauer	Anzahl der Zyklen
Anfängliche Denaturierung	95	30 s	1
Denaturierung	95	30 s	} 12-18
Primeranlagerung	55	1 min	
Verlängerung	68	2-4 min/kb	
Finale Verlängerung	68	10	1

**4.2.1.6 DNS-Sequenzierung**

Plasmid-DNS wurde mit dem *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* gereinigt und von der den Firmen STRATEC Molecular GmbH bzw. Source Bioscience sequenziert.

### 4.2.2 Zellbiologische Methoden

Sämtliche Lösungen, Puffer und Nährmedien für zellbiologische Methoden sind in 4.1.7.1 bis 4.1.7.3 zusammengefasst.

#### 4.2.2.1 Herstellung von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden 500 ml LB-Medium mit 1 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,7 pro ml ( $OD_{600}/ml$ ) bei 37 °C inkubiert. Nachdem die Zellsuspension 15 min auf Eis abgekühlt war, wurden die Zellen bei 4 °C abzentrifugiert (5000 Upm, 10 min, GS-3) und mit 500 ml eiskaltem ddH<sub>2</sub>O gewaschen (resuspendieren und abzentrifugieren). Das Pellet wurde in 10 ml kalter, steriler 10 % (v/v) Glycerinlösung aufgenommen und wiederum abzentrifugiert (6000 Upm, 10 min, 4 °C, SS-34). 40 µl-Aliquots der in 1,5 ml 10 % (v/v) Glycerinlösung (kalt und steril) resuspendierten Zellen wurden bei -80 °C bis zu deren weiteren Verwendung gelagert.

#### 4.2.2.2 Transformation von *E. coli*

Plasmid-DNS wurde durch Elektroporation von *E. coli*-Zellen aufgenommen. Auf Eis aufgetaute, elektrokompetente Zellen wurden mit DNS in vorgekühlten Elektroporationsküvetten vermischt und bei 2,5 MV; 25µF und 200 Ω transformiert. Nach dem Impuls wurden die Zellen in 500 µl SOC-Medium aufgenommen, für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und daraufhin auf LB-Selektionsnährböden (Antibiotika) ausplattiert.

XL1-Blue Zellen wurden transformiert, um Plasmid-DNS zu amplifizieren. Für die heterologe Expressionen von Zielgenen wurden BL21 (DE3) *Rosetta 2* Zellen verwendet, die das Plasmid pRARE2 tragen.

#### 4.2.2.3 Heterologe Expression in *E. coli*

Nukleotidsequenzen, die gewünschte Proteine oder Proteinfragmente kodieren, wurden in die multiplen Klonierungsstellen von ausgewählten Expressionsvektoren eingefügt und durch Sequenzierung überprüft. Frisch transformierte *E. coli* BL21 *Rosetta 2* Zellen wurden auf LB-Nährböden mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine über Nacht bei 37 °C und 200 Upm (Inkubationsschüttler Innova 44)

inkubierte Primärkultur (TB-Flüssigmedium) wurde verwendet, um die Hauptkultur (meist 1 L in 5 L-Kolben mit Schikane, bei 120 Upm) zu inokulieren (0,05 OD<sub>600</sub>/ml). Bei 1-1,5 OD<sub>600</sub>/ml wurden die Zellen etwa 30 min auf 25 °C für stabile oder 16 °C für aggregationsanfällige Proteine abgekühlt und die Expression mit 100 µM IPTG induziert. Nach 16-18 Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert (Sorvall RC 6+, Rotor FiberLite F10-4x1000 LEX oder Rotor FiberLite F10-6x500y, 5000 x g, RT), mit Wasser gewaschen, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei - 80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **4.2.2.4 Zellaufschluss**

Gefrorene Zellpellets wurden im Wasserbad bei RT aufgetaut und in Lysepuffer resuspendiert (etwa 30 ml pro Pellet einer 1 L Kultur). Nach anfänglicher Spülung des Hochdruckhomogenisator (EmulsiFlex-C5) mit Wasser und Lysepuffer wurde die Suspension dreimal durch das Gerät gepumpt (4 °C, 1500 bar). Die Zellen wurden durch wiederholende Zyklen von Kompression und Dekompression lysiert. Feste Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt (20000 x g, 4 °C mit Ultrazentrifuge Sorvall RC 6+ und SS34-Rotor) und der Überstand in entsprechenden Reinigungsschritten weiterverarbeitet. Sämtliche Schritte nach dem Zellaufschluss fanden gekühlt auf Eis statt.

#### **4.2.2.5 Hefetransformation**

Etwa 1 OD<sub>600</sub>/ml exponentiell wachsender Hefezellen (OD<sub>600</sub>/ml von 0,6 - 0,8 in SD-Medium) wurden bei 2000 x g für 3 min abzentrifugiert und zuerst mit ddH<sub>2</sub>O gefolgt von Trafo-Lösung 1 gewaschen. Die Zellen wurden in Trafo-Lösung 1 resuspendiert, die zur Erhöhung der Transformationseffizienz mit 0,2 µg/µl denaturierter Heringssperma-DNS versetzt war. Nach Zugabe der Plasmid-DNS und 800 µl Trafo-Lösung 2 wurde die Zellsuspension gut gemischt und in einem Regenerationsschritt bei 30 °C für 20 min unter Schütteln inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für 15 min. Kurz wurden die Zellen abzentrifugiert (10000 x g für 10 s), in 200 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen, auf SD-Selektionsplatten ausplattiert und bei 30 °C zwei bis drei Tage kultiviert.

#### **4.2.2.6 Cycloheximid-Abbauxperiment**

Cycloheximid blockiert die Proteinbiosynthese und ermöglicht die Untersuchung des Abbaus von Proteinen in Zellen. 20 OD<sub>600</sub> exponentiell wachsender Zellen wurden bei 2000 x g für

3 min abzentrifugiert, in 4,5 ml SD-Medium mit 0,35 mg/ml Cycloheximid resuspendiert und bei 30 °C kultiviert. Unmittelbar nach Zugabe des Antibiotikums und nach ein-, zwei- und dreistündiger Inkubation wurden je 1 ml der Kultur mit 500 µl eiskalter Stopplösung gründlich gemischt und auf Eis aufbewahrt. Nach der Entnahme aller Proben wurden diese bei 14000 x g für 10 s abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl Hefeaufschlusspuffer resuspendiert. Die Zellen wurden mechanisch lysiert. Hierzu wurden Glasperlen bis zum Meniskus der Suspension zugegeben und heftig im Vibrax für 2 min geschüttelt. Anschließend wurden die Proben mit 50 µl 4x SDS-Probenpuffer vermischt und bei 60 °C für 15 min erhitzt. Zelldebris und Glasperlen wurden in einem Zentrifugationsschritt bei 10000 x g für 10 min entfernt, die Proteine im Überstand per SDS-PAGE (4.2.3.7) aufgetrennt und Ubc6 im Immunoblot (4.2.3.9) detektiert. Sec61 diente als Ladekontrolle.

### 4.2.3 Biochemische Methoden

Puffer und Lösungen für biochemische Methoden sind in 4.1.7.4 zusammengefasst. Die Größe und Reinheit sämtlicher gereinigten Proteine und assemblierten Ubiquitinketten wurden durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft. Proben, die Ubiquitinketten enthielten wurden mit Harnstoff-Probenpuffer versetzt. Alle Proteine, vor allem Enzyme, wurden aliquotiert, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei - 80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Wiederholtes Auftauchen und Einfrieren wurde vermieden.

#### 4.2.3.1 Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Der Überstand abzentrifugierter Zelllysate wurde entweder auf gepackte *GSTrap*-Säulen geladen oder mit Glutathion-Sepharose versetzt. Beide Materialien wurden mit 1x PBS gewaschen. Die Reinigung erfolgte gemäß den Herstellerangaben mit Ausnahme, dass durchgängig ein 1x PBS Puffer verwendet wurde (4.1.7.4). Proteine gereinigt über *GSTrap*-Säulen wurden mit einem Gradienten von 100 % Waschpuffer zu 100 % Elutionspuffer in 10 min bei 1 ml/min eluiert. Die vereinten Fraktionen wurden konzentriert und die Proteinlösung durch Gelfiltration (HiLoad Superdex 16/600 75p oder 200p, äquilibriert mit 1x PBS) von Glutathion und Verunreinigungen befreit. Zielproteine gebunden an Glutathion-Sepharose im Batchverfahren wurden nach dem Waschschrift durch Spaltung mit PreScission-Protease über Nacht bei 4 °C freigesetzt. Proteinlösungen wurden mit Amicon Ultra Konzentratoren konzentriert.

#### 4.2.3.2 Reinigung von Proteinen mit His<sub>6</sub>-Affinitätsmarkierung

His<sub>6</sub>-Fusionsproteine in geklärten Zelllysaten wurden mittels *HiTrap TALON crude* Affinitätschromatographie nach Herstellerangaben angereichert. Danach wurden die Säulen mit Waschpuffer gespült bis die Absorption stabile Werte erreicht hatte. Die Proteine wurden mit einem Gradienten von 100 % Waschpuffer zu 100 % Elutionspuffer in 10 min bei 1 ml/min eluiert, konzentriert und durch Gelfiltration (HiLoad Superdex 16/600 75p oder 200p) in 1x PBS transferiert. E1-Enzym wurde abweichend mit durchgängig 2x PBS gereinigt. Linear verknüpfte Ubiquitinketten wurden durch Behandlung mit TEV-Protease von der Sepharose gelöst. His<sub>6</sub>-markiertes Rpn11 wurde als Heterodimer oder im *lid-core* Komplex gemäß [149] gereinigt.

#### 4.2.3.3 Reinigung von Ubiquitin und Ubiquitinvarianten

Durch Zentrifugation geklärte Zelllysate (~ 30 ml) wurden unter starker Durchmischung tropfenweise mit 300 µl 70% Perchlorsäure HClO<sub>4</sub> bei 4 °C versetzt und das Präzipitat in einem Zentrifugationsschritt abgetrennt (20000 x g, 4 °C mit Ultrazentrifuge Sorvall RC 6+ und SS34-Rotor) [159]. Der stark saure pH des Überstandes wurde mit 10 M NaOH auf einen Wert zwischen 7 und 8 eingestellt und mit Konzentratoren (3 kDa Ausschlussgröße) auf ein Volumen von 2 bis 5 ml, je nach Proteinkonzentration, eingeengt. Nach einer Zentrifugation bei 20000 x g bei 4 °C (Centrifuge 5415D) wurden je 2 ml auf eine Gelfiltrationssäule (HiLoad Superdex 26/600 75p) aufgetragen, die mit 1x PBS für Ubiquitin S20C oder 50 mM Tris/HCl pH 8 für alle andere Ubiquitinmoleküle äquilibriert war. Bei einer Flussrate von 1 ml/min eluierte Ubiquitin mit einem Maximum bei 224 ml. Die Lösung wurde auf eine Ubiquitinkonzentration von 5 bis 20 mM konzentriert.

#### 4.2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Konzentrationen von aufgereinigten Proteinen wurden mit dem *DC Protein Assay System*, basierend auf der Messmethode nach Lowry [160] bestimmt. Mittels einer Eichreihe mit definierten BSA-Konzentrationen wurden Proteinkonzentrationen über einen Vergleich der Absorption bei 750 nm berechnet.

### 4.2.3.5 Absorptionsmessungen

Die Zelldichte von Hefe- oder Bakterienkulturen wurde anhand der optischen Dichte bestimmt. Dafür wurden die Kulturen 1:10 mit dem jeweiligen Medium verdünnt und die Absorption bei 600 nm im Spectrophotometer ermittelt.

Proteinkonzentrationen oder Konzentrationen von Fluoreszenzfarbstoffen wurden anhand der gemessenen Extinktionswerten bei 280 nm oder der entsprechenden Wellenlänge des Absorptionsmaximums des Farbstoffes nach dem Lambert-Beer'sche Gesetz berechnet. Absorptionsmessungen erfolgten bei RT in Ultra-Mikro-Küvetten (UV-Bereich) oder in Einmalküvetten aus Kunststoff (sichtbarer Spektralbereich).

### 4.2.3.6 Spezifische Fluoreszenzmarkierung der Cysteinvariante von Ubiquitin

Für die spezifische Fluoreszenzmarkierung der Ubiquitinvariante S20C wurde der Farbstoff Alexa Fluor 488 oder 594 C5 Maleimide verwendet. Die Thiolgruppen von 60 nmol Ub S20C wurden mit 120 nmol tris-(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) in 400 µl PBS für 10 min bei RT reduziert. Die Markierungsreaktion mit vierfachem Überschuss an Fluoreszenzfarbstoff dauerte 90 min bei RT im Dunkeln. Zum Schluss wurden 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol zugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Zwei Entsalzungsschritte (Nap5 Säulen) in 50 mM Tris/HCl pH 8 entfernten überschüssigen Farbstoff und Reduktionsmittel. Das Eluat wurde mit Amicon Ultra Konzentratoren (Ausschluss 3 kDa) konzentriert. Die Effizienz der *in vitro* Markierungsreaktionen errechnet sich aus dem Verhältnis der Konzentration des Farbstoffes, ermittelt durch Absorptionsmessungen (4.2.3.5) und der Proteinkonzentration, bestimmt nach Lowry (4.2.3.4).

### 4.2.3.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden gemäß ihrer Molekülmasse im elektrischen Feld durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt [157]. Mit Harnstoff- oder SDS-Probenpuffer versetzte Proben wurden in einem diskontinuierlichen Gel im Sammelgel bei 80 V fokussiert. Die eigentliche Trennung von Proteinen erfolgte im Trenngel bei 120 V für etwa 90 min. Gemische aus Monoubiquitin, kurze Ubiquitinketten oder gereinigten Proteinen wurden in 18 %igen Trenngelen aufgetrennt. 9 %ige Gele wurden für Analysen von hochmolekularen Ubiquitinketten und dem E1-Enzym verwendet. Die bei RT aufgetrennten



Proteine wurden durch Fluoreszenz-Scanning, Coomassie-Färbung oder *Western Blotting* sichtbar gemacht.

#### **4.2.3.8 Fluoreszenz-Scanning**

Alexa-Fluorophor-markierte Proteine wurden direkt im Gel durch Fluoreszenz-Scanning (Typhoon FLA9500 Biomolecular Imager) unter Verwendung des Emissionsfilter LPB (510LP) nach Anregung bei 473 nm dargestellt. Die Intensitäten der Fluoreszenzsignale wurden mittels *ImageQuant TL software* quantifiziert.

#### **4.2.3.9 Western Blotting (Immunoblotting)**

Proteine aufgetrennt in einem SDS-Gel wurden in einer *Tank-Blot*-Apparatur gefüllt mit *Western-Blot*-Transferpuffer auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Transfer auf die in Methanol aktivierte Membran erfolgte eingebettet zwischen *Whatman*-Papier bei 250 mA für 90 min. Unspezifische Bindungsstellen wurden daraufhin mit einer Magermilch- oder BSA-Lösung (10 % (w/v) in 1x TBT) für 15 min bei RT gesättigt. Die Membran wurde in primärer Antikörperlösung (4.1.4) über Nacht bei 4 °C geschüttelt und am nächsten Tag dreimal mit PBS-Brij, gefolgt von drei Waschschritten mit PBS gewaschen. Nach einstündiger Inkubation mit sekundärem Antikörper (4.1.4) bei RT wurden die *Western Lightning Chemiluminescence* Lösungen auf der Membran gemischt. Katalysiert durch die Antikörper-konjugierte Peroxidase entsteht Licht, das durch Röntgenfilme (BioMax MR Film) detektiert wurde. Die Signale auf den belichteten Filmen wurden mithilfe einer Röntgenfilmentwicklungsmaschine (X-Ray Film Processor RGII) sichtbar gemacht.

#### **4.2.3.10 Coomassie-Färbung von Proteinen**

Größere Proteinmengen wurden in SDS-Gelen durch Färbungen mit Coomassie Brilliantblau R250 nachgewiesen. Hierzu wurden die Gele nach der Elektrophorese für 30 min bei RT in Coomassie Färbelösung geschüttelt. Die Entfärbung der Gele erfolgte entweder über Nacht in ddH<sub>2</sub>O oder für einige Stunden in Coomassie-Entfärber, bis sich die gefärbten Proteine gut vom Hintergrund abgrenzten. Anschließend wurden die Gele im Geltrockner getrocknet.

#### 4.2.3.11 Präparative Synthese und Reinigung von Ubiquitinketten

Linear verknüpfte (M1) Ubiquitinketten wurden plasmidkodiert als Fusionsproteine mit mehreren Ubiquitineinheiten hergestellt, während K48- und K63-verknüpfte Ketten enzymatisch in großen Mengen synthetisiert wurden. Es wurden Ubiquitinketten mit wildtypischen Ubiquitinmolekülen und/oder Ubiquitinvarianten (Aminosäureaustausche K48R, R42A, C-terminale His<sub>6</sub>-Markierung, Ub<sup>6His</sup>) gebildet. Der stufenweise Aufbau von Ketten mit Ubiquitinvarianten ist in 2.1.5 dargestellt. Die grundlegende *in vitro* Reaktion für die Herstellung von K48-Ketten beinhaltete 1 µM E1, 20 µM Cdc34, 900 µM Ub und 600 µM Ub<sup>6His</sup> in 20 mM ATP, 0,9 mM DTT, 9 mM MgCl<sub>2</sub> und 50 mM Tris/HCl pH 8. Ketten ohne His<sub>6</sub>-Markierung wurden abweichend mit 1,5 mM Ub assembliert. Ansätze für K63-Ketten enthalten 1 µM E1, 8 µM Ubc13, 8 µM Uev1a, 1200 µM Ub und 800 µM Ub<sup>6His</sup> (oder 2 mM Ub) in 20 mM ATP, 0,9 mM DTT, 9 mM MgCl<sub>2</sub> und 50 mM Tris/HCl pH 8. Fluoreszenzmarkierte Ubiquitinketten, die unter anderem für die Untersuchung von DUBs verwendet wurden, beinhalten 1 % fluoreszenzmarkierte Ubiquitinmoleküle. Ub488 wurde in entsprechenden Mengen den Reaktionen zugegeben. Präparative Verlängerungsreaktionen von K48-Ketten um eine Einheit setzten sich aus 100 µM vorgefertigte Ketten und 75 µM Ubiquitin (wt oder Variante) mit 0,5 µM E1, 3 µM Cdc34 in 10 mM ATP, 0,9 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 50 mM Tris/HCl pH 8 zusammen. Diubiquitin mit entweder distal oder proximal <sup>15</sup>N-markierten Ubiquitineinheiten, K48-Ub<sub>2</sub><sup>6His</sup> (<sup>15</sup>N-Ub1, Ub2 K48R), K48-Ub<sub>2</sub><sup>6His</sup> (<sup>15</sup>N-Ub2 K48R), K63-Ub<sub>2</sub><sup>6His</sup> (<sup>15</sup>N-Ub1, Ub2 K63R), K63-Ub<sub>2</sub><sup>6His</sup> (<sup>15</sup>N-Ub2 K63R) wurde in modifizierten Reaktionen assembliert. Für die Produktion von K48-Ub<sub>2</sub> wurde folgende Zusammensetzung gewählt: 2 µM E1, 40 µM Cdc34, 750 µM Ub K48R und 750 µM Ub<sup>6His</sup> (je eine von beiden Einheiten <sup>15</sup>N-markiert) in 20 mM ATP, 0,9 mM DTT, 9 mM MgCl<sub>2</sub> und 50 mM Tris/HCl pH 8. K63-Ub<sub>2</sub> wurde wie folgt aufgebaut: 2 µM E1, 10 µM Ubc13, 10 µM Uev1a, 1000 µM Ub K63R und 1000 µM Ub<sup>6His</sup> (je eine von beiden Einheiten <sup>15</sup>N-markiert) in 20 mM ATP, 0,9 mM DTT, 9 mM MgCl<sub>2</sub> und 50 mM Tris/HCl pH 8. Die *in vitro* Reaktionen des präparativen Kettenaufbaus wurden über Nacht (~ 18 h) bei 37 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation am nächsten Tag bei 20000 x g für 30 min bei 4 °C wurde das Kettengemisch durch Gelfiltration (HiLoad 26/60 Superdex 75pg, Flussrate: 1 ml/min, äquilibriert mit 1x PBS) aufgetrennt. His<sub>6</sub>-markierte Ketten wurden zuvor über Talon-Affinitätschromatographie (4.2.3.2) angereichert. Mittels Amicon Ultra Konzentratoren (entsprechende Ausschlussgrößen) wurden die einzelnen Ubiquitinketten konzentriert.

#### 4.2.3.12 Fluoreszenz-basierte Untersuchungen von *in vitro* Ubiquitinierungs- und Deubiquitinierungsreaktionen

Einerseits wurden *in vitro* Ubiquitinierungs- und Deubiquitinierungsreaktionen durch kontinuierliche Probenentnahme mit anschließender SDS-PAGE und Fluoreszenz-Scanning oder anti-Ubiquitin *Western Blotting* verfolgt. Für eine höhere Auflösung der Kinetiken wurde der Auf- und Abbau von Ubiquitinketten mit dem Spektralfluorimeter Fluoromax 4, gesteuert durch die FluorEssence Software, gemessen. Die Reaktionen wurden vor Messbeginn für 2 min temperiert und durch Zugabe von ATP gestartet. Während der Messungen wurde die Fluoreszenzküvette (105.251-QS) auf konstanter Temperatur gehalten (Ubiquitinierung mit Ausnahmen bei 20 °C, Deubiquitinierung bei 30 °C). Die Kinetiken der Reaktionen wurden mit Excel und SigmaPlot analysiert. Sämtliche Messdaten dieser Arbeit wurden mit SigmaPlot graphisch dargestellt. Durch eine Probenentnahme nach Sättigung der jeweiligen Reaktion konnte die Effizienz der Ubiquitinierung beurteilt werden (SDS-PAGE, Fluoreszenz-Scanning und Coomassie-Färbung). Es wurden mindesten Triplikate gemessen und die Standardabweichung bestimmt.

##### 4.2.3.12.1 FRET-basierte Untersuchungen der *in vitro* Kettensynthese

Bei FRET-basierten Untersuchungen von *in vitro* Ubiquitinierungsreaktionen mit Ub488 und Ub594 wurden sowohl die Akzeptoremission bei 609 nm und die Donoremission bei 514 nm nach Anregung des Donors bei 495 nm als auch die Akzeptoremission bei 609 nm nach Anregung desselbigen bei 590 nm gemessen (Multigroup-Funktion von FluorEssence Software). Die Bandbreite für die Extinktion betrug 1,5 nm, für die Emission 3,5 nm. Die Integrationszeit wurde auf 0,2 s festgesetzt. Die Temperatur wurde auf 20 °C bzw. 30 °C festgelegt. Für einen Vergleich von Signalen verschiedener Reaktionen wurden die anfänglichen Fluoreszenzwerte auf eins normalisiert. Ubiquitinierungsreaktionen mit vollständiger Fluoreszenzmarkierung bestanden aus 0,05 µM E1 (hUbe1), 2 µM Ubc7, 2 µM cCue1 oder die RGA Variante und 2 µM cHrd1, 0,5 mM DTT, 4 mM ATP, 4 mM MgCl<sub>2</sub> in 20 mM HEPES/NaOH, pH 7,5. Die Gesamtkonzentration von Ubiquitin betrug 3 µM, 1,5 µM Ub488 donormarkiert, 1,5 µM Ub594 akzeptormarkiert. Reaktionen mit partieller Fluoreszenzmarkierung beinhalteten ebenfalls 3 µM Ubiquitin, zusammengesetzt aus 0,3 µM Ub488, 0,3 µM Ub594 und 2,4 µM nicht-markiertes Ub. Nachdem das eingesetzte ATP durch Zugabe von 10 µM Apyrase nach 20-30 min aufgebraucht war, wurden die Ketten durch 4 µM Usp8 partiell abgebaut (Abbildung 2-5).

#### 4.2.3.12.2 Fluoreszenzanisotropiemessungen von *in vitro* Ubiquitinierungsreaktionen

Polarisierte Emissionen bei 514 nm nach Anregung bei 493 nm wurden während Ubiquitinierungs- und Deubiquitinierungsreaktionen über die Zeit verfolgt und als Anisotropiewert angegeben. Die Extinktionsbandbreite war auf 3,5 nm und die der Emission auf 6 nm festgelegt. Die Integrationszeit betrug 0,2 s. *In vitro* Ubiquitinierungsreaktionen mit dem Ziel die *de novo* Kettenbildung zu untersuchen bestanden in Abbildung 2-10 A aus 0,1  $\mu$ M E1, 2  $\mu$ M Ubc7, 2  $\mu$ M cCue1 oder RGA-Variante und 2  $\mu$ M cHrd1 in 0,5 mM DTT, 4 mM ATP, 4 mM  $MgCl_2$  und 50 mM Tris/HCl, pH 8. Die gesamte Ubiquitinkonzentration betrug 10  $\mu$ M, wobei 0,2  $\mu$ M markiert (Ub488) und 9,8  $\mu$ M nicht-markiert (Ub) waren. In Abbildung 2-10 C setzten sich die Reaktionen aus 0,05  $\mu$ M E1, 2  $\mu$ M Ubc7, 2  $\mu$ M cCue1 oder RGA-Variante und 2  $\mu$ M cHrd1 in 0,5 mM DTT, 4 mM ATP, 4 mM  $MgCl_2$  und 20 mM HEPES/NaOH, pH 7,5 zusammen. Insgesamt wurden 3  $\mu$ M Ubiquitin mit 0,3  $\mu$ M 488 und 2,7  $\mu$ M Ub eingesetzt.

Verlängerungsreaktionen von Ubiquitinketten beinhalteten 0,15  $\mu$ M E1, 2  $\mu$ M Ubc7, 1,2  $\mu$ M cCue1 oder RGA Variante und 1  $\mu$ M cHrd1 in 0,5 mM DTT, 4 mM ATP, 4 mM  $MgCl_2$  und 50 mM Tris/HCl, pH 8. Die Gesamtkonzentration von Ubiquitin und Ubiquitinketten betrug 15  $\mu$ M, aufgeteilt in 0,2  $\mu$ M Ub488 und 14,8  $\mu$ M Ubiquitin oder vorgebildete Ketten. Die nicht-markierten Ubiquitinmoleküle enthielten eine C-terminale His<sub>6</sub>-Markierung. Es wurden folgende vorgefertigten Ubiquitinketten verwendet (Ubiquitineinheiten werden angefangen von der proximaler zu der distaler Einheit nummeriert): linear-Ub<sub>2</sub>, K48-Ub<sub>2</sub>, K48-Ub<sub>2</sub> mit 1% Ub488, K48-Ub<sub>2</sub><sup>6His</sup>, K48-Ub<sub>2</sub><sup>6His</sup> (Ub1 R42A), K48-Ub<sub>2</sub><sup>6His</sup> (Ub2 R42A), K63-Ub<sub>2</sub>, K63-Ub<sub>2</sub><sup>6His</sup>, K63-Ub<sub>2</sub><sup>6His</sup> (Ub1 K48R), K63-Ub<sub>2</sub><sup>6His</sup> (Ub1 R42A), K63-Ub<sub>2</sub><sup>6His</sup> (Ub2 R42A), K48-Ub<sub>3</sub>, linear-Ub<sub>4</sub><sup>6His</sup> (Ub1,2,3 K48R), linear-Ub<sub>4</sub><sup>6His</sup> (Ub2,3,4 K48R), K48-Ub<sub>4</sub><sup>6His</sup>, K48-Ub<sub>4</sub><sup>6His</sup> (Ub1 R42A), K48-Ub<sub>4</sub><sup>6His</sup> (Ub2 R42A), K48-Ub<sub>4</sub><sup>6His</sup> (Ub3 R42A), K48-Ub<sub>4</sub><sup>6His</sup> (Ub4 R42A), K48-Ub<sub>4</sub><sup>6His</sup> (Ub2,3 R42A), K48-Ub<sub>4</sub><sup>6His</sup> (Ub1,2,3 R42A), K48-Ub<sub>4</sub><sup>6His</sup> (Ub1,2,3,4 R42A), K63-Ub<sub>4</sub>, K63-Ub<sub>4</sub><sup>6His</sup> (Ub1,2,3 K48R), K63-Ub<sub>4</sub><sup>6His</sup> (Ub2,3,4 K48R).

Die Verlängerungsreaktion von K48-Ub<sub>4</sub> in Abbildung 2-17 B wurde nach Sättigung der Fluoreszenzanisotropie mit 10  $\mu$ M Apyrase behandelt und nach etwa 15 min mit 500 nm Usp2<sub>cat</sub> versetzt.

Verknüpfungsreaktionen von K48-Diubiquitinmolekülen beinhalteten abweichend zu dem fluoreszenzmarkierten Monoubiquitin von Verlängerungsreaktionen K48-Ub<sub>2</sub> mit 1 % Ub488 (Abbildung 2-14).

Die Endprodukte der vollständig abgelaufenen Reaktionen wurden durch SDS-PAGE, Fluoreszenz-Scanning und Coomassie-Färbung analysiert.

#### 4.2.3.12.3 Analysen von Deubiquitinierungsreaktionen

Die Deubiquitinierung von vorgefertigten K48- oder K63-Ub<sub>4</sub> durch Ubp6, Rpn8/11 und *lid core* (Rpn5, -6, -8, -9, und -11) wurde durch eine kontinuierliche Entnahme von Proben gefolgt von SDS-PAGE und Fluoreszenz-Scanning verfolgt (2.2.1). Die verwendeten Ubiquitinketten beinhalten 1 % Ub488, das im Polymer statistisch verteilt vorlag. Die Reaktion beinhaltete 25 µM Ub<sub>4</sub> und 25 µM DUB in 1x PBS und verliefen bei 30 °C.

Fluoreszenzanisotropiemessungen von Deubiquitinierungsreaktionen bei 30 °C wurden mit einer Bandbreite für die Extinktion von 4 nm und für die Emission von 8 nm bei einer Integrationszeit von 0,2 s durchgeführt. Ubp6 wurde ein Kettengemisch (Abbildung 2-34) oder einzelne Ketten als Substrat angeboten. Die Ketten enthielten 1 % Ub488. Das eingesetzte Gemisch aus Ub<sub>2</sub> bis Ub<sub>6</sub>, aufgebaut aus 50 µM Monoubiquitin, wurde mit 10 µM oder 20 µM Ubp6 in 1x PBS inkubiert. Ferner wurden Kontrollmessungen nur mit 50 µM Monoubiquitin oder mit Ketten ohne Ubp6 durchgeführt. In Experimenten mit Einzelketten wurden entweder 25 µM K48-Ub<sub>2</sub> mit 5, 10, 20, 30 oder 40 µM Ubp6 versetzt (Abbildung 2-35 A, C, E, G) oder 40 µM Ubp6 mit 5, 8,3 oder 12,5 µM K48-Ub<sub>4</sub> (Abbildung 2-35 B, D, F, H). Proben entnommen vor und nach Zugabe des DUBs (vollständig abgelaufene Reaktion) wurden durch SDS-PAGE, Fluoreszenz-Scanning und Coomassie-Färbung untersucht.

#### 4.2.3.13 Beladungsreaktionen von E1- oder E2-Enzymen

*In vitro* Reaktionen mit dem Ziel die Beladung des E1-Enzyms mit Ubiquitinketten zu untersuchen (Abbildung 2-16) beinhalteten 1 µM E1, optional 5 µM Ubc7 in 4 mM ATP, 4 mM MgCl<sub>2</sub> und 50 mM Tris/HCl, pH 8. Zusätzlich wurden 10 µM K48- oder K63-verknüpftes Ub<sub>2</sub> oder Ub<sub>4</sub> oder Monoubiquitin zugegeben. Jeweils 1 % der Ubiquitineinheiten war fluoreszenzmarkiert (Ub488). Die Reaktionen wurden bei RT durchgeführt. Nach 2 und 30 min wurden Proben entnommen, die mit Harnstoff-Probenpuffer mit und ohne Reduktionsmittel gemischt wurden, und durch 9 %ige und 18 %ige SDS-PAGE gefolgt von Fluoreszenz-Scanning und anti-Ubiquitin *Western Blotting* analysiert.

Die Beladungsreaktionen von Ubc7 in 2.1.3.2 beinhalten abweichend zu den Reaktionen der *de novo* Kettenbildung kein cCue1 und cHrd1.

## Literaturverzeichnis

- [1] Nisius, L. and Grzesiek, S. (2012): Key stabilizing elements of protein structure identified through pressure and temperature perturbation of its hydrogen bond network, *Nat Chem* (vol. 4), No. 9, pp. 711-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22914191>
- [2] Vijay-Kumar, S.; Bugg, C. E. and Cook, W. J. (1987): Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution, *J Mol Biol* (vol. 194), No. 3, pp. 531-44. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3041007>
- [3] Lee, S. Y.; Pullen, L.; Virgil, D. J.; Castaneda, C. A.; Abeykoon, D.; Bolon, D. N. and Fushman, D. (2014): Alanine scan of core positions in ubiquitin reveals links between dynamics, stability, and function, *J Mol Biol* (vol. 426), No. 7, pp. 1377-89. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24361330>
- [4] Wiborg, O.; Pedersen, M. S.; Wind, A.; Berglund, L. E.; Marcker, K. A. and Vuust, J. (1985): The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences, *EMBO J* (vol. 4), No. 3, pp. 755-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2988935>
- [5] Ozkaynak, E.; Finley, D. and Varshavsky, A. (1984): The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein, *Nature* (vol. 312), No. 5995, pp. 663-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6095120>
- [6] Finley, D.; Bartel, B. and Varshavsky, A. (1989): The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis, *Nature* (vol. 338), No. 6214, pp. 394-401. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2538753>
- [7] Finley, D.; Ozkaynak, E. and Varshavsky, A. (1987): The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses, *Cell* (vol. 48), No. 6, pp. 1035-46. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3030556>
- [8] Komander, D. and Rape, M. (2012): The ubiquitin code, *Annu Rev Biochem* (vol. 81), pp. 203-29. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22524316>
- [9] Dikic, I.; Wakatsuki, S. and Walters, K. J. (2009): Ubiquitin-binding domains - from structures to functions, *Nat Rev Mol Cell Biol* (vol. 10), No. 10, pp. 659-71. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19773779>
- [10] Herrmann, J.; Lerman, L. O. and Lerman, A. (2007): Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation, *Circ Res* (vol. 100), No. 9, pp. 1276-91. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17495234>
- [11] Hochstrasser, M. (2009): Origin and function of ubiquitin-like proteins, *Nature* (vol. 458), No. 7237, pp. 422-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325621>
- [12] van der Veen, A. G. and Ploegh, H. L. (2012): Ubiquitin-like proteins, *Annu Rev Biochem* (vol. 81), pp. 323-57. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22404627>

- 
- [13] Buchberger, A.; Howard, M. J.; Proctor, M. and Bycroft, M. (2001): The UBX domain: a widespread ubiquitin-like module, *J Mol Biol* (vol. 307), No. 1, pp. 17-24. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11243799>
- [14] Bruderer, R. M.; Brasseur, C. and Meyer, H. H. (2004): The AAA ATPase p97/VCP interacts with its alternative co-factors, Ufd1-Npl4 and p47, through a common bipartite binding mechanism, *J Biol Chem* (vol. 279), No. 48, pp. 49609-16. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15371428>
- [15] Bays, N. W.; Wilhovsky, S. K.; Goradia, A.; Hodgkiss-Harlow, K. and Hampton, R. Y. (2001): HRD4/NPL4 is required for the proteasomal processing of ubiquitinated ER proteins, *Mol Biol Cell* (vol. 12), No. 12, pp. 4114-28. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739805>
- [16] Jentsch, S. and Rumpf, S. (2007): Cdc48 (p97): a "molecular gearbox" in the ubiquitin pathway?, *Trends Biochem Sci* (vol. 32), No. 1, pp. 6-11. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17142044>
- [17] Raasi, S. and Wolf, D. H. (2007): Ubiquitin receptors and ERAD: a network of pathways to the proteasome, *Semin Cell Dev Biol* (vol. 18), No. 6, pp. 780-91. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17942349>
- [18] Leggett, D. S.; Hanna, J.; Borodovsky, A.; Crosas, B.; Schmidt, M.; Baker, R. T.; Walz, T.; Ploegh, H. and Finley, D. (2002): Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function, *Mol Cell* (vol. 10), No. 3, pp. 495-507. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408819>
- [19] Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998): The ubiquitin system, *Annu Rev Biochem* (vol. 67), pp. 425-79. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759494>
- [20] Pickart, C. M. and Eddins, M. J. (2004): Ubiquitin: structures, functions, mechanisms, *Biochim Biophys Acta* (vol. 1695), No. 1-3, pp. 55-72. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15571809>
- [21] Eletr, Z. M.; Huang, D. T.; Duda, D. M.; Schulman, B. A. and Kuhlman, B. (2005): E2 conjugating enzymes must disengage from their E1 enzymes before E3-dependent ubiquitin and ubiquitin-like transfer, *Nat Struct Mol Biol* (vol. 12), No. 10, pp. 933-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16142244>
- [22] Finley, D.; Ulrich, H. D.; Sommer, T. and Kaiser, P. (2012): The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* (vol. 192), No. 2, pp. 319-60. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23028185>
- [23] Pickart, C. M. (2001): Mechanisms underlying ubiquitination, *Annu Rev Biochem* (vol. 70), pp. 503-33. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11395416>
- [24] Ozkan, E.; Yu, H. and Deisenhofer, J. (2005): Mechanistic insight into the allosteric activation of a ubiquitin-conjugating enzyme by RING-type ubiquitin ligases, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 102), No. 52, pp. 18890-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16365295>

- [25] Das, R.; Mariano, J.; Tsai, Y. C.; Kalathur, R. C.; Kostova, Z.; Li, J.; Tarasov, S. G.; McFeeters, R. L.; Altieri, A. S.; Ji, X.; Byrd, R. A. and Weissman, A. M. (2009): Allosteric activation of E2-RING finger-mediated ubiquitylation by a structurally defined specific E2-binding region of gp78, *Mol Cell* (vol. 34), No. 6, pp. 674-85. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19560420>
- [26] Scheffner, M.; Nuber, U. and Huibregtse, J. M. (1995): Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade, *Nature* (vol. 373), No. 6509, pp. 81-3. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7800044>
- [27] Wilkinson, K. D. (2000): Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome, *Semin Cell Dev Biol* (vol. 11), No. 3, pp. 141-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10906270>
- [28] Koegl, M.; Hoppe, T.; Schlenker, S.; Ulrich, H. D.; Mayer, T. U. and Jentsch, S. (1999): A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly, *Cell* (vol. 96), No. 5, pp. 635-44. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10089879>
- [29] Rumpf, S. and Jentsch, S. (2006): Functional division of substrate processing cofactors of the ubiquitin-selective Cdc48 chaperone, *Mol Cell* (vol. 21), No. 2, pp. 261-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16427015>
- [30] Crosas, B.; Hanna, J.; Kirkpatrick, D. S.; Zhang, D. P.; Tone, Y.; Hathaway, N. A.; Buecker, C.; Leggett, D. S.; Schmidt, M.; King, R. W.; Gygi, S. P. and Finley, D. (2006): Ubiquitin chains are remodeled at the proteasome by opposing ubiquitin ligase and deubiquitinating activities, *Cell* (vol. 127), No. 7, pp. 1401-13. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17190603>
- [31] Hoege, C.; Pfander, B.; Moldovan, G. L.; Pyrowolakis, G. and Jentsch, S. (2002): RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO, *Nature* (vol. 419), No. 6903, pp. 135-41. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12226657>
- [32] Carter, S.; Bischof, O.; Dejean, A. and Vousden, K. H. (2007): C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53, *Nat Cell Biol* (vol. 9), No. 4, pp. 428-35. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17369817>
- [33] Haglund, K.; Sigismund, S.; Polo, S.; Szymkiewicz, I.; Di Fiore, P. P. and Dikic, I. (2003): Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation, *Nat Cell Biol* (vol. 5), No. 5, pp. 461-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12717448>
- [34] Finley, D. (2009): Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome, *Annu Rev Biochem* (vol. 78), pp. 477-513. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19489727>
- [35] Weissman, A. M. (2001): Themes and variations on ubiquitylation, *Nat Rev Mol Cell Biol* (vol. 2), No. 3, pp. 169-78. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11265246>



- 
- [36] Meyer, H. J. and Rape, M. (2014): Enhanced protein degradation by branched ubiquitin chains, *Cell* (vol. 157), No. 4, pp. 910-21. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24813613>
- [37] Dixon, E. K.; Castaneda, C. A.; Kashyap, T. R.; Wang, Y. and Fushman, D. (2013): Nonenzymatic assembly of branched polyubiquitin chains for structural and biochemical studies, *Bioorg Med Chem* (vol. 21), No. 12, pp. 3421-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23557636>
- [38] Michel, M. A.; Elliott, P. R.; Swatek, K. N.; Simicek, M.; Pruneda, J. N.; Wagstaff, J. L.; Freund, S. M. and Komander, D. (2015): Assembly and specific recognition of k29- and k33-linked polyubiquitin, *Mol Cell* (vol. 58), No. 1, pp. 95-109. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25752577>
- [39] Hurley, J. H.; Lee, S. and Prag, G. (2006): Ubiquitin-binding domains, *Biochem J* (vol. 399), No. 3, pp. 361-72. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17034365>
- [40] Husnjak, K. and Dikic, I. (2012): Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions, *Annu Rev Biochem* (vol. 81), pp. 291-322. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22482907>
- [41] Eddins, M. J.; Varadan, R.; Fushman, D.; Pickart, C. M. and Wolberger, C. (2007): Crystal structure and solution NMR studies of Lys48-linked tetraubiquitin at neutral pH, *J Mol Biol* (vol. 367), No. 1, pp. 204-11. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17240395>
- [42] Ryabov, Y. and Fushman, D. (2006): Interdomain mobility in di-ubiquitin revealed by NMR, *Proteins* (vol. 63), No. 4, pp. 787-96. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16609980>
- [43] Varadan, R.; Walker, O.; Pickart, C. and Fushman, D. (2002): Structural properties of polyubiquitin chains in solution, *J Mol Biol* (vol. 324), No. 4, pp. 637-47. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12460567>
- [44] Komander, D.; Reyes-Turcu, F.; Licchesi, J. D.; Odenwaelder, P.; Wilkinson, K. D. and Barford, D. (2009): Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains, *EMBO Rep* (vol. 10), No. 5, pp. 466-73. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19373254>
- [45] Hicke, L. (2001): Protein regulation by monoubiquitin, *Nat Rev Mol Cell Biol* (vol. 2), No. 3, pp. 195-201. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11265249>
- [46] Kirisako, T.; Kamei, K.; Murata, S.; Kato, M.; Fukumoto, H.; Kanie, M.; Sano, S.; Tokunaga, F.; Tanaka, K. and Iwai, K. (2006): A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains, *EMBO J* (vol. 25), No. 20, pp. 4877-87. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17006537>
- [47] Ikeda, F. (2015): Linear ubiquitination signals in adaptive immune responses, *Immunol Rev* (vol. 266), No. 1, pp. 222-36. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26085218>

- [48] Xu, P.; Duong, D. M.; Seyfried, N. T.; Cheng, D.; Xie, Y.; Robert, J.; Rush, J.; Hochstrasser, M.; Finley, D. and Peng, J. (2009): Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation, *Cell* (vol. 137), No. 1, pp. 133-45. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19345192>
- [49] Wickliffe, K. E.; Williamson, A.; Meyer, H. J.; Kelly, A. and Rape, M. (2011): K11-linked ubiquitin chains as novel regulators of cell division, *Trends Cell Biol* (vol. 21), No. 11, pp. 656-63. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21978762>
- [50] Hirsch, C.; Gauss, R.; Horn, S. C.; Neuber, O. and Sommer, T. (2009): The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum, *Nature* (vol. 458), No. 7237, pp. 453-60. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325625>
- [51] Kornitzer, D. and Ciechanover, A. (2000): Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation, *J Cell Physiol* (vol. 182), No. 1, pp. 1-11. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10567911>
- [52] Balch, W. E.; Morimoto, R. I.; Dillin, A. and Kelly, J. W. (2008): Adapting proteostasis for disease intervention, *Science* (vol. 319), No. 5865, pp. 916-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18276881>
- [53] Schubert, U.; Anton, L. C.; Gibbs, J.; Norbury, C. C.; Yewdell, J. W. and Bennink, J. R. (2000): Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes, *Nature* (vol. 404), No. 6779, pp. 770-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10783891>
- [54] Hirsch, C.; Gauss, R. and Sommer, T. (2006): Coping with stress: cellular relaxation techniques, *Trends Cell Biol* (vol. 16), No. 12, pp. 657-63. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17084628>
- [55] Buchberger, A.; Bukau, B. and Sommer, T. (2010): Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms, *Mol Cell* (vol. 40), No. 2, pp. 238-52. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20965419>
- [56] Hartl, F. U.; Bracher, A. and Hayer-Hartl, M. (2011): Molecular chaperones in protein folding and proteostasis, *Nature* (vol. 475), No. 7356, pp. 324-32. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21776078>
- [57] Inoue, Y. and Klionsky, D. J. (2010): Regulation of macroautophagy in *Saccharomyces cerevisiae*, *Semin Cell Dev Biol* (vol. 21), No. 7, pp. 664-70. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20359542>
- [58] Kanki, T. and Klionsky, D. J. (2009): Atg32 is a tag for mitochondria degradation in yeast, *Autophagy* (vol. 5), No. 8, pp. 1201-2. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19736522>
- [59] Kanki, T.; Wang, K.; Cao, Y.; Baba, M. and Klionsky, D. J. (2009): Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy, *Dev Cell* (vol. 17), No. 1, pp. 98-109. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19619495>

- 
- [60] Ohsumi, Y. (2001): Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems, *Nat Rev Mol Cell Biol* (vol. 2), No. 3, pp. 211-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11265251>
- [61] Lu, K.; Psakhye, I. and Jentsch, S. (2014): Autophagic clearance of polyQ proteins mediated by ubiquitin-Atg8 adaptors of the conserved CUET protein family, *Cell* (vol. 158), No. 3, pp. 549-63. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25042851>
- [62] Lu, K.; Psakhye, I. and Jentsch, S. (2014): A new class of ubiquitin-Atg8 receptors involved in selective autophagy and polyQ protein clearance, *Autophagy* (vol. 10), No. 12, pp. 2381-2. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25470352>
- [63] McLean, J. R.; Chaix, D.; Ohi, M. D. and Gould, K. L. (2011): State of the APC/C: organization, function, and structure, *Crit Rev Biochem Mol Biol* (vol. 46), No. 2, pp. 118-36. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21261459>
- [64] Arndt, V.; Rogon, C. and Hohfeld, J. (2007): To be, or not to be--molecular chaperones in protein degradation, *Cell Mol Life Sci* (vol. 64), No. 19-20, pp. 2525-41. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17565442>
- [65] Mehnert, M.; Sommermeyer, F.; Berger, M.; Kumar Lakshmipathy, S.; Gauss, R.; Aebi, M.; Jarosch, E. and Sommer, T. (2015): The interplay of Hrd3 and the molecular chaperone system ensures efficient degradation of misfolded secretory proteins, *Mol Biol Cell* (vol. 26), No. 2, pp. 185-94. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25428985>
- [66] Lander, E. S.; Linton, L. M.; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, M. C.; Baldwin, J.; Devon, K.; Dewar, K.; Doyle, M.; FitzHugh, W.; Funke, R.; Gage, D.; Harris, K.; Heaford, A.; Howland, J.; Kann, L.; Lehoczky, J.; LeVine, R.; McEwan, P.; McKernan, K.; Meldrim, J.; Mesirov, J. P.; Miranda, C.; Morris, W.; Naylor, J.; Raymond, C.; Rosetti, M.; Santos, R.; Sheridan, A.; Sougnez, C.; Stange-Thomann, N.; Stojanovic, N.; Subramanian, A.; Wyman, D.; Rogers, J.; Sulston, J.; Ainscough, R.; Beck, S.; Bentley, D.; Burton, J.; Clee, C.; Carter, N.; Coulson, A.; Deadman, R.; Deloukas, P.; Dunham, A.; Dunham, I.; Durbin, R.; French, L.; Grafham, D.; Gregory, S.; Hubbard, T.; Humphray, S.; Hunt, A.; Jones, M.; Lloyd, C.; McMurray, A.; Matthews, L.; Mercer, S.; Milne, S.; Mullikin, J. C.; Mungall, A.; Plumb, R.; Ross, M.; Shownkeen, R.; Sims, S.; Waterston, R. H.; Wilson, R. K.; Hillier, L. W.; McPherson, J. D.; Marra, M. A.; Mardis, E. R.; Fulton, L. A.; Chinwalla, A. T.; Pepin, K. H.; Gish, W. R.; Chissoe, S. L.; Wendl, M. C.; Delehaanty, K. D.; Miner, T. L.; Delehaanty, A.; Kramer, J. B.; Cook, L. L.; Fulton, R. S.; Johnson, D. L.; Minx, P. J.; Clifton, S. W.; Hawkins, T.; Branscomb, E.; Predki, P.; Richardson, P.; Wenning, S.; Slezak, T.; Doggett, N.; Cheng, J. F.; Olsen, A.; Lucas, S.; Elkin, C.; Uberbacher, E.; Frazier, M.; Gibbs, R. A.; Muzny, D. M.; Scherer, S. E.; Bouck, J. B.; Sodergren, E. J.; Worley, K. C.; Rives, C. M.; Gorrell, J. H.; Metzker, M. L.; Naylor, S. L.; Kucherlapati, R. S.; Nelson, D. L.; Weinstock, G. M.; Sakaki, Y.; Fujiyama, A.; Hattori, M.; Yada, T.; Toyoda, A.; Itoh, T.; Kawagoe, C.; Watanabe, H.; Totoki, Y.; Taylor, T.; Weissenbach, J.; Heilig, R.; Saurin, W.; Artiguenave, F.; Brottier, P.; Bruls, T.; Pelletier, E.; Robert, C.; Wincker, P.; Smith, D. R.; Doucette-Stamm, L.; Rubenfield, M.; Weinstock, K.; Lee, H. M.; Dubois, J.; Rosenthal, A.; Platzer, M.; Nyakatura, G.; Taudien, S.; Rump, A.; Yang, H.; Yu, J.; Wang, J.; Huang, G.; Gu, J.; Hood, L.; Rowen, L.; Madan, A.; Qin, S.; Davis, R. W.; Federspiel, N. A.; Abola, A.

- P.; Proctor, M. J.; Myers, R. M.; Schmutz, J.; Dickson, M.; Grimwood, J.; Cox, D. R.; Olson, M. V.; Kaul, R.; Shimizu, N.; Kawasaki, K.; Minoshima, S.; Evans, G. A.; Athanasiou, M.; Schultz, R.; Roe, B. A.; Chen, F.; Pan, H.; Ramser, J.; Lehrach, H.; Reinhardt, R.; McCombie, W. R.; de la Bastide, M.; Dedhia, N.; Blocker, H.; Hornischer, K.; Nordsiek, G.; Agarwala, R.; Aravind, L.; Bailey, J. A.; Bateman, A.; Batzoglou, S.; Birney, E.; Bork, P.; Brown, D. G.; Burge, C. B.; Cerutti, L.; Chen, H. C.; Church, D.; Clamp, M.; Copley, R. R.; Doerks, T.; Eddy, S. R.; Eichler, E. E.; Furey, T. S.; Galagan, J.; Gilbert, J. G.; Harmon, C.; Hayashizaki, Y.; Haussler, D.; Hermjakob, H.; Hokamp, K.; Jang, W.; Johnson, L. S.; Jones, T. A.; Kasif, S.; Kasprzyk, A.; Kennedy, S.; Kent, W. J.; Kitts, P.; Koonin, E. V.; Korf, I.; Kulp, D.; Lancet, D.; Lowe, T. M.; McLysaght, A.; Mikkelsen, T.; Moran, J. V.; Mulder, N.; Pollara, V. J.; Ponting, C. P.; Schuler, G.; Schultz, J.; Slater, G.; Smit, A. F.; Stupka, E.; Szustakowski, J.; Thierry-Mieg, D.; Thierry-Mieg, J.; Wagner, L.; Wallis, J.; Wheeler, R.; Williams, A.; Wolf, Y. I.; Wolfe, K. H.; Yang, S. P.; Yeh, R. F.; Collins, F.; Guyer, M. S.; Peterson, J.; Felsenfeld, A.; Wetterstrand, K. A.; Patrinos, A.; Morgan, M. J.; de Jong, P.; Catanese, J. J.; Osoegawa, K.; Shizuya, H.; Choi, S. and Chen, Y. J. (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* (vol. 409), No. 6822, pp. 860-921. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11237011>
- [67] Vashist, S. and Ng, D. T. (2004): Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control, *J Cell Biol* (vol. 165), No. 1, pp. 41-52. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15078901>
- [68] Carvalho, P.; Goder, V. and Rapoport, T. A. (2006): Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins, *Cell* (vol. 126), No. 2, pp. 361-73. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16873066>
- [69] Bays, N. W.; Gardner, R. G.; Seelig, L. P.; Joazeiro, C. A. and Hampton, R. Y. (2001): Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation, *Nat Cell Biol* (vol. 3), No. 1, pp. 24-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11146622>
- [70] Deak, P. M. and Wolf, D. H. (2001): Membrane topology and function of Der3/Hrd1p as a ubiquitin-protein ligase (E3) involved in endoplasmic reticulum degradation, *J Biol Chem* (vol. 276), No. 14, pp. 10663-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11139575>
- [71] Plemper, R. K.; Bordallo, J.; Deak, P. M.; Taxis, C.; Hitt, R. and Wolf, D. H. (1999): Genetic interactions of Hrd3p and Der3p/Hrd1p with Sec61p suggest a retro-translocation complex mediating protein transport for ER degradation, *J Cell Sci* (vol. 112 ( Pt 22)), pp. 4123-34. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10547371>
- [72] Gardner, R. G.; Swarbrick, G. M.; Bays, N. W.; Cronin, S. R.; Wilhovsky, S.; Seelig, L.; Kim, C. and Hampton, R. Y. (2000): Endoplasmic reticulum degradation requires lumen to cytosol signaling. Transmembrane control of Hrd1p by Hrd3p, *J Cell Biol* (vol. 151), No. 1, pp. 69-82. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11018054>
- [73] Horn, S. C.; Hanna, J.; Hirsch, C.; Volkwein, C.; Schutz, A.; Heinemann, U.; Sommer, T. and Jarosch, E. (2009): Usa1 functions as a scaffold of the HRD-ubiquitin ligase, *Mol Cell* (vol. 36), No. 5, pp. 782-93. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20005842>

- 
- [74] Taxis, C.; Hitt, R.; Park, S. H.; Deak, P. M.; Kostova, Z. and Wolf, D. H. (2003): Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperone requirement of ERAD, *J Biol Chem* (vol. 278), No. 38, pp. 35903-13. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12847107>
- [75] Mehnert, M.; Sommer, T. and Jarosch, E. (2014): Der1 promotes movement of misfolded proteins through the endoplasmic reticulum membrane, *Nat Cell Biol* (vol. 16), No. 1, pp. 77-86. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24292014>
- [76] Biederer, T.; Volkwein, C. and Sommer, T. (1997): Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface, *Science* (vol. 278), No. 5344, pp. 1806-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9388185>
- [77] Bazirgan, O. A. and Hampton, R. Y. (2008): Cue1p is an activator of Ubc7p E2 activity in vitro and in vivo, *J Biol Chem* (vol. 283), No. 19, pp. 12797-810. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18321851>
- [78] Ye, Y.; Meyer, H. H. and Rapoport, T. A. (2003): Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains, *J Cell Biol* (vol. 162), No. 1, pp. 71-84. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12847084>
- [79] Meyer, H. H.; Wang, Y. and Warren, G. (2002): Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4, *EMBO J* (vol. 21), No. 21, pp. 5645-52. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12411482>
- [80] Davies, J. M.; Tsuruta, H.; May, A. P. and Weis, W. I. (2005): Conformational changes of p97 during nucleotide hydrolysis determined by small-angle X-Ray scattering, *Structure* (vol. 13), No. 2, pp. 183-95. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15698563>
- [81] Rouiller, I.; Butel, V. M.; Latterich, M.; Milligan, R. A. and Wilson-Kubalek, E. M. (2000): A major conformational change in p97 AAA ATPase upon ATP binding, *Mol Cell* (vol. 6), No. 6, pp. 1485-90. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163220>
- [82] Rao, H. and Sastry, A. (2002): Recognition of specific ubiquitin conjugates is important for the proteolytic functions of the ubiquitin-associated domain proteins Dsk2 and Rad23, *J Biol Chem* (vol. 277), No. 14, pp. 11691-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11805121>
- [83] Travers, K. J.; Patil, C. K.; Wodicka, L.; Lockhart, D. J.; Weissman, J. S. and Walter, P. (2000): Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation, *Cell* (vol. 101), No. 3, pp. 249-58. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10847680>
- [84] Gardner, B. M.; Pincus, D.; Gotthardt, K.; Gallagher, C. M. and Walter, P. (2013): Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response, *Cold Spring Harb Perspect Biol* (vol. 5), No. 3, p. a013169. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23388626>



- [85] Walter, P. and Ron, D. (2011): The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation, *Science* (vol. 334), No. 6059, pp. 1081-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22116877>
- [86] Dohmen, R. J.; Madura, K.; Bartel, B. and Varshavsky, A. (1991): The N-end rule is mediated by the UBC2(RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 88), No. 16, pp. 7351-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1651502>
- [87] Varshavsky, A. (2011): The N-end rule pathway and regulation by proteolysis, *Protein Sci* (vol. 20), No. 8, pp. 1298-345. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21633985>
- [88] Robzyk, K.; Recht, J. and Osley, M. A. (2000): Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast, *Science* (vol. 287), No. 5452, pp. 501-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10642555>
- [89] Eddins, M. J.; Carlile, C. M.; Gomez, K. M.; Pickart, C. M. and Wolberger, C. (2006): Mms2-Ubc13 covalently bound to ubiquitin reveals the structural basis of linkage-specific polyubiquitin chain formation, *Nat Struct Mol Biol* (vol. 13), No. 10, pp. 915-20. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16980971>
- [90] Hofmann, R. M. and Pickart, C. M. (1999): Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair, *Cell* (vol. 96), No. 5, pp. 645-53. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10089880>
- [91] Wickliffe, K. E.; Lorenz, S.; Wemmer, D. E.; Kuriyan, J. and Rape, M. (2011): The mechanism of linkage-specific ubiquitin chain elongation by a single-subunit E2, *Cell* (vol. 144), No. 5, pp. 769-81. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376237>
- [92] Cohen-Fix, O.; Peters, J. M.; Kirschner, M. W. and Koshland, D. (1996): Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p, *Genes Dev* (vol. 10), No. 24, pp. 3081-93. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8985178>
- [93] Yamamoto, A.; Guacci, V. and Koshland, D. (1996): Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s), *J Cell Biol* (vol. 133), No. 1, pp. 99-110. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8601617>
- [94] Uhlmann, F.; Lottspeich, F. and Nasmyth, K. (1999): Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1, *Nature* (vol. 400), No. 6739, pp. 37-42. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10403247>
- [95] Rodrigo-Brenni, M. C. and Morgan, D. O. (2007): Sequential E2s drive polyubiquitin chain assembly on APC targets, *Cell* (vol. 130), No. 1, pp. 127-39. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17632060>
- [96] Verma, R.; Feldman, R. M. and Deshaies, R. J. (1997): SIC1 is ubiquitinated in vitro by a pathway that requires CDC4, CDC34, and cyclin/CDK activities, *Mol Biol Cell* (vol. 8), No. 8, pp. 1427-37. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9285816>

- [97] Barral, Y.; Jentsch, S. and Mann, C. (1995): G1 cyclin turnover and nutrient uptake are controlled by a common pathway in yeast, *Genes Dev* (vol. 9), No. 4, pp. 399-409. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7883165>
- [98] Choi, Y. S.; Wu, K.; Jeong, K.; Lee, D.; Jeon, Y. H.; Choi, B. S.; Pan, Z. Q.; Ryu, K. S. and Cheong, C. (2010): The human Cdc34 carboxyl terminus contains a non-covalent ubiquitin binding activity that contributes to SCF-dependent ubiquitination, *J Biol Chem* (vol. 285), No. 23, pp. 17754-62. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20353940>
- [99] Bagola, K.; von Delbruck, M.; Dittmar, G.; Scheffner, M.; Ziv, I.; Glickman, M. H.; Ciechanover, A. and Sommer, T. (2013): Ubiquitin binding by a CUE domain regulates ubiquitin chain formation by ERAD E3 ligases, *Mol Cell* (vol. 50), No. 4, pp. 528-39. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23665229>
- [100] Khmelinskii, A.; Blaszcak, E.; Pantazopoulou, M.; Fischer, B.; Omnus, D. J.; Le Dez, G.; Brossard, A.; Gunnarsson, A.; Barry, J. D.; Meurer, M.; Kirrmaier, D.; Boone, C.; Huber, W.; Rabut, G.; Ljungdahl, P. O. and Knop, M. (2014): Protein quality control at the inner nuclear membrane, *Nature* (vol. 516), No. 7531, pp. 410-3. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25519137>
- [101] Harper, J. W. and Schulman, B. A. (2006): Structural complexity in ubiquitin recognition, *Cell* (vol. 124), No. 6, pp. 1133-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16564007>
- [102] Hicke, L.; Schubert, H. L. and Hill, C. P. (2005): Ubiquitin-binding domains, *Nat Rev Mol Cell Biol* (vol. 6), No. 8, pp. 610-21. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16064137>
- [103] Bienko, M.; Green, C. M.; Crosetto, N.; Rudolf, F.; Zapart, G.; Coull, B.; Kannouche, P.; Wider, G.; Peter, M.; Lehmann, A. R.; Hofmann, K. and Dikic, I. (2005): Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis, *Science* (vol. 310), No. 5755, pp. 1821-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16357261>
- [104] Yan, J. and Jetten, A. M. (2008): RAP80 and RNF8, key players in the recruitment of repair proteins to DNA damage sites, *Cancer Lett* (vol. 271), No. 2, pp. 179-90. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18550271>
- [105] Sims, J. J. and Cohen, R. E. (2009): Linkage-specific avidity defines the lysine 63-linked polyubiquitin-binding preference of rap80, *Mol Cell* (vol. 33), No. 6, pp. 775-83. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19328070>
- [106] Sato, Y.; Yoshikawa, A.; Mimura, H.; Yamashita, M.; Yamagata, A. and Fukai, S. (2009): Structural basis for specific recognition of Lys 63-linked polyubiquitin chains by tandem UIMs of RAP80, *EMBO J* (vol. 28), No. 16, pp. 2461-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19536136>
- [107] Varadan, R.; Assfalg, M.; Raasi, S.; Pickart, C. and Fushman, D. (2005): Structural determinants for selective recognition of a Lys48-linked polyubiquitin chain by a UBA

- p. 687-98. URL:
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15949443>
- [108] Mayor, T.; Graumann, J.; Bryan, J.; MacCoss, M. J. and Deshaies, R. J. (2007): Quantitative profiling of ubiquitylated proteins reveals proteasome substrates and the substrate repertoire influenced by the Rpn10 receptor pathway, *Mol Cell Proteomics* (vol. 6), No. 11, pp. 1885-95. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17644757>
- [109] Verma, R.; Oania, R.; Graumann, J. and Deshaies, R. J. (2004): Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system, *Cell* (vol. 118), No. 1, pp. 99-110. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15242647>
- [110] Husnjak, K.; Elsasser, S.; Zhang, N.; Chen, X.; Randles, L.; Shi, Y.; Hofmann, K.; Walters, K. J.; Finley, D. and Dikic, I. (2008): Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor, *Nature* (vol. 453), No. 7194, pp. 481-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18497817>
- [111] Inobe, T.; Fishbain, S.; Prakash, S. and Matouschek, A. (2011): Defining the geometry of the two-component proteasome degron, *Nat Chem Biol* (vol. 7), No. 3, pp. 161-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21278740>
- [112] Forster, A. and Hill, C. P. (2003): Proteasome degradation: enter the substrate, *Trends Cell Biol* (vol. 13), No. 11, pp. 550-3. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14573346>
- [113] Groll, M.; Bajorek, M.; Kohler, A.; Moroder, L.; Rubin, D. M.; Huber, R.; Glickman, M. H. and Finley, D. (2000): A gated channel into the proteasome core particle, *Nat Struct Biol* (vol. 7), No. 11, pp. 1062-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11062564>
- [114] Groll, M.; Bochtler, M.; Brandstetter, H.; Clausen, T. and Huber, R. (2005): Molecular machines for protein degradation, *Chembiochem* (vol. 6), No. 2, pp. 222-56. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15678420>
- [115] Yao, T. and Cohen, R. E. (2002): A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome, *Nature* (vol. 419), No. 6905, pp. 403-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12353037>
- [116] Lee, M. J.; Lee, B. H.; Hanna, J.; King, R. W. and Finley, D. (2011): Trimming of ubiquitin chains by proteasome-associated deubiquitinating enzymes, *Mol Cell Proteomics* (vol. 10), No. 5, p. R110 003871. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20823120>
- [117] Lander, G. C.; Estrin, E.; Matyskiela, M. E.; Bashore, C.; Nogales, E. and Martin, A. (2012): Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle, *Nature* (vol. 482), No. 7384, pp. 186-91. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22237024>
- [118] Verma, R.; Aravind, L.; Oania, R.; McDonald, W. H.; Yates, J. R., 3rd; Koonin, E. V. and Deshaies, R. J. (2002): Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and



- degradation by the 26S proteasome, *Science* (vol. 298), No. 5593, pp. 611-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12183636>
- [119] Peth, A.; Besche, H. C. and Goldberg, A. L. (2009): Ubiquitinated proteins activate the proteasome by binding to Usp14/Ubp6, which causes 20S gate opening, *Mol Cell* (vol. 36), No. 5, pp. 794-804. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20005843>
- [120] Lee, B. H.; Lee, M. J.; Park, S.; Oh, D. C.; Elsasser, S.; Chen, P. C.; Gartner, C.; Dimova, N.; Hanna, J.; Gygi, S. P.; Wilson, S. M.; King, R. W. and Finley, D. (2010): Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14, *Nature* (vol. 467), No. 7312, pp. 179-84. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20829789>
- [121] Sloper-Mould, K. E.; Jemc, J. C.; Pickart, C. M. and Hicke, L. (2001): Distinct functional surface regions on ubiquitin, *J Biol Chem* (vol. 276), No. 32, pp. 30483-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11399765>
- [122] Lakowicz, Joseph R. (2006): *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer, New York, ISBN: 9780387312781 0387312781.
- [123] Salvesen, G.; Lloyd, C. and Farley, D. (1987): cDNA encoding a human homolog of yeast ubiquitin 1, *Nucleic Acids Res* (vol. 15), No. 13, p. 5485. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3037496>
- [124] Ye, Y.; Blaser, G.; Horrocks, M. H.; Ruedas-Rama, M. J.; Ibrahim, S.; Zhukov, A. A.; Orte, A.; Klenerman, D.; Jackson, S. E. and Komander, D. (2012): Ubiquitin chain conformation regulates recognition and activity of interacting proteins, *Nature* (vol. 492), No. 7428, pp. 266-70. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23201676>
- [125] Pastushok, L.; Moraes, T. F.; Ellison, M. J. and Xiao, W. (2005): A single Mms2 "key" residue insertion into a Ubc13 pocket determines the interface specificity of a human Lys63 ubiquitin conjugation complex, *J Biol Chem* (vol. 280), No. 18, pp. 17891-900. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15749714>
- [126] Choi, Y. S.; Lee, Y. J.; Lee, S. Y.; Shi, L.; Ha, J. H.; Cheong, H. K.; Cheong, C.; Cohen, R. E. and Ryu, K. S. (2015): Differential ubiquitin binding by the acidic loops of Ube2g1 and Ube2r1 enzymes distinguishes their Lys-48-ubiquitylation activities, *J Biol Chem* (vol. 290), No. 4, pp. 2251-63. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25471371>
- [127] Lemus, L. and Goder, V. (2014): Regulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation (ERAD) by Ubiquitin, *Cells* (vol. 3), No. 3, pp. 824-47. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25100021>
- [128] Bagola, K.; Mehnert, M.; Jarosch, E. and Sommer, T. (2011): Protein dislocation from the ER, *Biochim Biophys Acta* (vol. 1808), No. 3, pp. 925-36. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20599420>
- [129] Meusser, B.; Hirsch, C.; Jarosch, E. and Sommer, T. (2005): ERAD: the long road to destruction, *Nat Cell Biol* (vol. 7), No. 8, pp. 766-72. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16056268>

- [130] Kang, R. S.; Daniels, C. M.; Francis, S. A.; Shih, S. C.; Salerno, W. J.; Hicke, L. and Radhakrishnan, I. (2003): Solution structure of a CUE-ubiquitin complex reveals a conserved mode of ubiquitin binding, *Cell* (vol. 113), No. 5, pp. 621-30. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787503>
- [131] Schmidt, M.; Hanna, J.; Elsasser, S. and Finley, D. (2005): Proteasome-associated proteins: regulation of a proteolytic machine, *Biol Chem* (vol. 386), No. 8, pp. 725-37. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16201867>
- [132] Liu, C.; van Dyk, D.; Xu, P.; Choe, V.; Pan, H.; Peng, J.; Andrews, B. and Rao, H. (2010): Ubiquitin chain elongation enzyme Ufd2 regulates a subset of Doa10 substrates, *J Biol Chem* (vol. 285), No. 14, pp. 10265-72. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20159987>
- [133] Richly, H.; Rape, M.; Braun, S.; Rumpf, S.; Hoege, C. and Jentsch, S. (2005): A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting, *Cell* (vol. 120), No. 1, pp. 73-84. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15652483>
- [134] Silva, G. M.; Finley, D. and Vogel, C. (2015): K63 polyubiquitination is a new modulator of the oxidative stress response, *Nat Struct Mol Biol* (vol. 22), No. 2, pp. 116-23. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25622294>
- [135] Chen, B.; Mariano, J.; Tsai, Y. C.; Chan, A. H.; Cohen, M. and Weissman, A. M. (2006): The activity of a human endoplasmic reticulum-associated degradation E3, gp78, requires its Cue domain, RING finger, and an E2-binding site, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 103), No. 2, pp. 341-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16407162>
- [136] Liu, S.; Chen, Y.; Li, J.; Huang, T.; Tarasov, S.; King, A.; Weissman, A. M.; Byrd, R. A. and Das, R. (2012): Promiscuous interactions of gp78 E3 ligase CUE domain with polyubiquitin chains, *Structure* (vol. 20), No. 12, pp. 2138-50. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23123110>
- [137] Kostova, Z.; Mariano, J.; Scholz, S.; Koenig, C. and Weissman, A. M. (2009): A Ubc7p-binding domain in Cue1p activates ER-associated protein degradation, *J Cell Sci* (vol. 122), No. Pt 9, pp. 1374-81. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19366730>
- [138] Kelly, A.; Wickliffe, K. E.; Song, L.; Fedrigo, I. and Rape, M. (2014): Ubiquitin chain elongation requires E3-dependent tracking of the emerging conjugate, *Mol Cell* (vol. 56), No. 2, pp. 232-45. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25306918>
- [139] Kim, H. T.; Kim, K. P.; Lledias, F.; Kisselev, A. F.; Scaglione, K. M.; Skowyra, D.; Gygi, S. P. and Goldberg, A. L. (2007): Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages, *J Biol Chem* (vol. 282), No. 24, pp. 17375-86. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17426036>
- [140] Fang, N. N.; Ng, A. H.; Measday, V. and Mayor, T. (2011): Hul5 HECT ubiquitin ligase plays a major role in the ubiquitylation and turnover of cytosolic misfolded

- proteins, *Nat Cell Biol* (vol. 13), No. 11, pp. 1344-52. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21983566>
- [141] Brown, J. S. and Jackson, S. P. (2015): Ubiquitylation, neddylation and the DNA damage response, *Open Biol* (vol. 5), No. 4, p. 150018. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25833379>
- [142] Hanna, J.; Hathaway, N. A.; Tone, Y.; Crosas, B.; Elsasser, S.; Kirkpatrick, D. S.; Leggett, D. S.; Gygi, S. P.; King, R. W. and Finley, D. (2006): Deubiquitinating enzyme Ubp6 functions noncatalytically to delay proteasomal degradation, *Cell* (vol. 127), No. 1, pp. 99-111. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17018280>
- [143] Park, S.; Kim, W.; Tian, G.; Gygi, S. P. and Finley, D. (2011): Structural defects in the regulatory particle-core particle interface of the proteasome induce a novel proteasome stress response, *J Biol Chem* (vol. 286), No. 42, pp. 36652-66. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21878652>
- [144] Kohlmann, S.; Schafer, A. and Wolf, D. H. (2008): Ubiquitin ligase Hul5 is required for fragment-specific substrate degradation in endoplasmic reticulum-associated degradation, *J Biol Chem* (vol. 283), No. 24, pp. 16374-83. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18436532>
- [145] Amerik, A. Y.; Li, S. J. and Hochstrasser, M. (2000): Analysis of the deubiquitinating enzymes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biol Chem* (vol. 381), No. 9-10, pp. 981-92. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11076031>
- [146] Hanna, J.; Leggett, D. S. and Finley, D. (2003): Ubiquitin depletion as a key mediator of toxicity by translational inhibitors, *Mol Cell Biol* (vol. 23), No. 24, pp. 9251-61. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14645527>
- [147] Chernova, T. A.; Allen, K. D.; Wesoloski, L. M.; Shanks, J. R.; Chernoff, Y. O. and Wilkinson, K. D. (2003): Pleiotropic effects of Ubp6 loss on drug sensitivities and yeast prion are due to depletion of the free ubiquitin pool, *J Biol Chem* (vol. 278), No. 52, pp. 52102-15. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14559899>
- [148] Hu, M.; Li, P.; Song, L.; Jeffrey, P. D.; Chenova, T. A.; Wilkinson, K. D.; Cohen, R. E. and Shi, Y. (2005): Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14, *EMBO J* (vol. 24), No. 21, pp. 3747-56. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16211010>
- [149] Mansour, W.; Nakasone, M. A.; von Delbruck, M.; Yu, Z.; Krutauz, D.; Reis, N.; Kleifeld, O.; Sommer, T.; Fushman, D. and Glickman, M. H. (2015): Disassembly of Lys11 and mixed linkage polyubiquitin conjugates provides insights into function of proteasomal deubiquitinases Rpn11 and Ubp6, *J Biol Chem* (vol. 290), No. 8, pp. 4688-704. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25389291>
- [150] Borodovsky, A.; Kessler, B. M.; Casagrande, R.; Overkleeft, H. S.; Wilkinson, K. D. and Ploegh, H. L. (2001): A novel active site-directed probe specific for deubiquitylating enzymes reveals proteasome association of USP14, *EMBO J* (vol. 20), No. 18, pp. 5187-96. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566882>

- [151] Guterman, A. and Glickman, M. H. (2004): Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome, *J Biol Chem* (vol. 279), No. 3, pp. 1729-38. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14581483>
- [152] Worden, E. J.; Padovani, C. and Martin, A. (2014): Structure of the Rpn11-Rpn8 dimer reveals mechanisms of substrate deubiquitination during proteasomal degradation, *Nat Struct Mol Biol* (vol. 21), No. 3, pp. 220-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24463465>
- [153] Rogov, V. V.; Rozenknop, A.; Rogova, N. Y.; Lohr, F.; Tikole, S.; Jaravine, V.; Guntert, P.; Dikic, I. and Dotsch, V. (2012): A universal expression tag for structural and functional studies of proteins, *Chembiochem* (vol. 13), No. 7, pp. 959-63. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22434781>
- [154] Berndsen, C. E. and Wolberger, C. (2011): A spectrophotometric assay for conjugation of ubiquitin and ubiquitin-like proteins, *Anal Biochem* (vol. 418), No. 1, pp. 102-10. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21771579>
- [155] Christensen, D. E.; Brzovic, P. S. and Klevit, R. E. (2007): E2-BRCA1 RING interactions dictate synthesis of mono- or specific polyubiquitin chain linkages, *Nat Struct Mol Biol* (vol. 14), No. 10, pp. 941-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17873885>
- [156] Walter, J.; Urban, J.; Volkwein, C. and Sommer, T. (2001): Sec61p-independent degradation of the tail-anchored ER membrane protein Ubc6p, *EMBO J* (vol. 20), No. 12, pp. 3124-31. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11406589>
- [157] Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* (vol. 227), No. 5259, pp. 680-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063>
- [158] Plemper, R. K.; Egner, R.; Kuchler, K. and Wolf, D. H. (1998): Endoplasmic reticulum degradation of a mutated ATP-binding cassette transporter Pdr5 proceeds in a concerted action of Sec61 and the proteasome, *J Biol Chem* (vol. 273), No. 49, pp. 32848-56. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9830032>
- [159] Pickart, C. M. and Raasi, S. (2005): Controlled synthesis of polyubiquitin chains, *Methods Enzymol* (vol. 399), pp. 21-36. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16338346>
- [160] Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem* (vol. 193), No. 1, pp. 265-75. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A (Ala)	Alanin
AAA	ATPase Associated with a variety of cellular Activities
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosin-5'monophosphat
APC/C	anaphase promoting complex/cyclosome
APS	Ammoniumpersulfat
Asi	Amino acid sensor independent
Asp	Asparagin
ATF6	Activating transcription factor 6
ATG	Autophagy-related protein 8
ATP	Adenosin-5'triphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BSA	Bovine serum albumin
bp	Base pairs
BRAC1	Breast Cancer 1
Bre1	Brefeldin A-sensitivity protein 1
Brij58	Polyethylenglykol-hexadecylether
bzw.	beziehungsweise
c (cCue1, cHrd1)	cytosolic fragment
C (Cys)	Cystein
Cdc	Cell Division Cycle
CHIP	C-terminus of Hsc70-Interacting Protein
CHX	Cycloheximid
CP	core particle
CSP	Chemical Shift Perturbations
CUE/Cue1	Coupling of Ubiquitin conjugation to Endoplasmic reticulum degradation
ddH <sub>2</sub> O	zweifach deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribunuceic acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat
Doa10	Degradation of alpha factor
Dsk2	dominant suppressor of Kar1
DTT	Dithiotreitol
DUIM	double-sided UIM
E (Glu)	Glutaminsäure
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitinligase
E4	Ubiquitinketten-verlängerndes Enzym
ECL	Enhanced ChemoLuminescence
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Proteinabbau
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
μF	Mikro-Farad (elektrische Kapazität)
f oder fw	forward
r oder rev	reverse
G (Gly)	Glycin
g	Erdbeschleunigung
GST	Glutathion-S-Transferase
H (His)	Histidin
H2A	Histon 2A
HECT	Homologous to E6AP Carboxy-Terminus
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
His <sub>6</sub>	Hexahistidin-Markierung
hUb	humanes Ubiquitin
Hul5	HECT ubiquitin ligase 5
Hmg-coA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
Hrd1	HMG-coA Reductase Degradation 1
Hrd3	HMG-coA Reductase Degradation 3
HRP	Horseradish peroxidase

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
HSP	Heat Shock Protein
I (Ile)	Isoleucin
IPTG	Isopropyl-D-Thiogalaktosid
Ire1	Inositol-requiring enzyme 1
k	Geschwindigkeitskonstante
K (Lys)	Lysin
K48-	über K48 verknüpfte Ubiquitineinheiten
K63-	über K63 verknüpfte Ubiquitineinheiten
Kan	Kanamycin
Kar2	Karyogamy gene, yeast homolog of the mammalian BiP gene
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
L (Leu)	Leucin
LB	Lysogeny Broth
lid core	Rpn5, -6, -8, -9, und -11
linear (lin)	linear verknüpfte Ketten über M1
M (Met)	Methionin
Mat	Mating type
MIU	Motif interacting with ubiquitin
NEM	N-Ethylmaleimid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Npl4	Nuclear Protein Localization
NZF	Npl4-Zinkfinger
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
P (Pro)	Prolin
PBS	Phosphate-buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PDB	Protein Data Bank
PDI	Protein Disulfid Isomerase
PEG	Polyethylenglykol
PERK	Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PH	pleckstrin homology

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
PMSF	Polymethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R (Arg)	Arginin
Rad23	Radiation sensitive 23
Rap80	Receptor-associated protein 80
RING	Really Interesting New Gene
RNF8	Ring finger protein 8
RP	regulatorisches Partikel
Rpn	Proteasome Regulatory Particle, Non-ATPase-like
Rpt	Regulatory Particle Triple ATPase
RT	Raumtemperatur
S (Ser)	Serin
Scc1	Subunit of cohesin-complex 1
SCF	SKP1/Cullin/F-Box
SD	Synthetic defined
SDS	sodiumdodecylsulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sec61	Secretory61
Sic1	Substrate/Subunit Inhibitor of Cyclin-dependent protein kinase 1
SOC	Super optimal broth with catabolite repression
SPR	Surface Plasmon Resonance
SRM	Selected Reaction Monitoring
TAE	Tris-Acetat-Puffer mit EDTA
TB	Terrific Broth
TBT	Tris buffer with Tween
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin
$\Delta$ TM	ohne Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl) aminomethan
U	Units
U7BR	Ubc7-bindende Region
Ub	Monoubiquitin
Ub488	Ub S20C mit Alexa Fluor 488 Fluorophor markiert



<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
Ub594	Ub S20C mit Alexa Fluor 594 Fluorophor markiert
Ub <sub>2</sub>	Diubiquitin
Ub <sub>3</sub>	Triubiquitin
Ub <sub>4</sub>	Tetraubiquitin
Ub1	proximale Ubiquitineinheit in einer Kette
Ub2	Ubiquitineinheit benachbart zu Ub1
Ub3	zweite Ubiquitineinheit benachbart zu Ub1
Ub4	dritte Ubiquitineinheit benachbart zu Ub1
Ub S20C	Cysteinvariante von Ubiquitin mit der Substitution-S20C
Ub R42A	Ubiquitinvariante mit der Substitution-R42A (schwächere Bindung der CUE-Domäne)
Ub K48R	Ubiquitinvariante mit der Substitution-K48R (keine K48-abhängige Polymerisierung)
Ub K63R	Ubiquitinvariante mit der Substitution-K63R (keine K63-abhängige Polymerisierung)
UBA	Ubiquitin-Associated domain
Ubc	Ubiquitin-Conjugating enzyme
UBD	Ubiquitin binding domain
UBL	Ubiquitin-Like domain
UBM	Ubiquitin binding motif
UBX	Ubiquitin regulatory X
Ubx2	Ubiquitin regulatory X 2
Ube2S	Ubiquitin-conjugating Enzyme E2S
Ufd1	Ubiquitin Fusion Degradation protein 1
Ufd2	Ubiquitin Fusion Degradation protein 2
Uev1a	Ubiquitin conjugating enzyme variant 1a
UGT1	UDP-Glukose-Glykoprotein-Glycosyltransferase
UIM	Ubiquitin interacting motif
Upm	Umdrehungen pro Minute
UPR	Unfolded Protein Response
UPRE	UPR element
Ubr1	Ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 1
Usa1	U1-Snp1 Associating

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
Usp/Ubp	Ubiquitin-specific protease
UV	Ultraviolett
ÜN	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen zu Volumen Verhältnis
w/v	Masse zu Volumen Verhältnis
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid
Yos9	Yeast OS-9 homolog
YPD	Yeast extract, peptone, dextrose

## Publikationen und Vorträge

### Publikationen

- A) Bagola, K.; **von Delbrück, M.**; Dittmar, G.; Scheffner, M.; Ziv, I.; Glickman, M. H.; Ciechanover, A. and Sommer, T. (2013): Ubiquitin binding by a CUE domain regulates ubiquitin chain formation by ERAD E3 ligases, Mol Cell (vol. 50), No. 4, pp. 528-39. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23665229>
- B) Mansour, W.; Nakasone, M. A.; **von Delbrück, M.**; Yu, Z.; Krutauz, D.; Reis, N.; Kleifeld, O.; Sommer, T.; Fushman, D. and Glickman, M. H. (2015): Disassembly of Lys11 and mixed linkage polyubiquitin conjugates provides insights into function of proteasomal deubiquitinases Rpn11 and Ubp6, J Biol Chem (vol. 290), No. 8, pp. 4688-704. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25389291>

### Vorträge

- 1) EMBO-Konferenz „Ubiquitin and ubiquitin-like modifiers: From molecular mechanisms to human diseases“ Cavtat, Croatia, September 2015
- 2) SFB 740 Seminar, Berlin, März 2015
- 3) Cancer Club Lecture Series des MDC, Berlin, Februar 2015
- 4) Symposium der Deutsch-Israelische Projektkooperation (DIP), Berlin, Dezember 2014
- 5) Symposium der Deutsch-Israelische Projektkooperation (DIP), Haifa, Israel, Februar 2013

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und nur mit den angegebenen Hilfen und Hilfsmitteln angefertigt habe. Ich habe die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin vom 06. Juli 2009 zur Kenntnis genommen. Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Titel.

Berlin, den 29.10.2015

Maximilian von Delbrück

## **Danksagung**

Zuletzt möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Zeit am MDC begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Sommer für die Betreuung meiner Promotion. Seine stetige Unterstützung und Zuspruch haben nicht nur zu dieser Arbeit, sondern auch zu meiner persönlichen Entwicklung während dieser Zeit beigetragen. Ich danke Ihm dafür mein Doktorvater gewesen zu sein.

Ich danke Dr. Ernst Jarosch für seine wissenschaftliche Beratung.

Ferner Danke ich meinen Kooperationspartnern für die gute und diskussionsreiche Zusammenarbeit. Massenspektrometrische Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Gunnar Dittmar durchgeführt. Ubp6 und Rpn11 wurden zusammen mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Glickman analysiert. NMR-basierte Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Volker Dötsch realisiert.

Die Arbeitsgruppe Sommer ist ein großartiges Team, in dem ich mich jederzeit wohl gefühlt habe. Die gegenseitige Hilfsbereitschaft und das Miteinander haben mir geholfen so manche Hürde zu überwinden. Ich danke der gesamten Gruppe für die tolle Zeit: Maren Berger, Holger Brendebach, Christian Hirsch, Anett Köhler, Susanne Kreßner, Sathish Lakshmipathy, Christian Lips, Martin Mehnert, Marcel Nowak, Annika Weber, Angelika Wittstruck und Franziska Zimmermann. Danke an Katrin Bagola, die mich zu Beginn eingearbeitet hat, an Lukas Pluska für die gute Zusammenarbeit in gemeinsamen Projekten und an Corinna Volkwein, der guten Seele der Gruppe.

Ich danke meinem treuen Freund Fabian Feutlinske.

Meiner Annekatrin Aue danke ich von ganzem Herzen für ihren bedingungslosen, liebevollen Beistand. Ich freue mich auf unseren gemeinsamen Lebensweg. Größtes Glück und Erfüllung erfahre ich seit dem 20.05.2015 durch unsere Tochter Frieda.

Zuletzt möchte ich meiner Mutter Roswitha von Delbrück und meinem Vater Clemens Adelbert von Delbrück danken. Von jeher gebt ihr mir Rückhalt und Zuversicht. Ihr seid eine Konstante in meinem Leben, an der ich mich vertrauensvoll orientieren kann.